

Aus dem Fachbereich Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung humaner CD4⁺
T-Zell Subtypen
Characterization of human CD4⁺ T cell subtypes

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2017

vorgelegt von
Sarah Kircher
geb. am 14.08.1986 in Zweibrücken

Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Summary	8
2 Zusammenfassung	10
3 Einleitung	13
3.1 Die Aufgaben des Immunsystems	13
3.2 Die Entwicklung der T-Zellen	14
3.3 Die Helfer des Immunsystems, die CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	16
3.3.1 Die Entdeckung der CD4 ⁺ T- Zellsotypen: Th1 und Th2	16
3.3.2 T-Helfer 17 (Th17)	17
3.3.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)	18
3.3.4 In-vitro Polarisierung von CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	20
3.4 IL-21, ein Zytokin mit vielen unterschiedlichen Aufgaben	20
3.5 Kalzium	21
3.6 Speichergesteuerter Kalziumeinstrom	22
3.7 Orai	25
3.8 Das Aktivatormolekül STIM	26
3.9 Weitere Ionenkanäle mit Einfluss auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom	27
3.10 Programmierter Zelltod (Apoptose)	29
4 Material	31
4.1 Antikörper	31
4.2 Reagenzien	32
4.3 Lösungen	34
4.4 qPCR Primer	37
4.5 siRNA	37
4.6 Reagenziensysteme	37
5 Methoden	38
5.1 Präparation humaner Lymphocyten (PBMCs) aus LRS Kammern	38
5.2 CD4 ⁺ Isolation aus PBMCs	38
5.3 In-vitro Polarisierung humaner CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	39
5.4 Transfektion der CD4 ⁺ T-Zell Subtypen mittels Elektroporation	43
5.5 Durchflusszytometrie	43
5.5.1 Intrazelluläre Zytokin Färbung	43
5.5.2 Transkriptionsfaktor Färbung	44
5.5.3 Annexin V Färbung	44

5.5.4	Durchflusszytometrische Messungen	45
5.6	Bestimmung der mRNA Expressionsmenge	46
5.6.1	RNA Isolation	46
5.6.2	Umschreibung in cDNA	46
5.6.3	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	47
5.7	Bestimmung der Proteinmenge in CD4 ⁺ Zellen	48
5.7.1	BCA Assay	48
5.7.2	SDS-Page	49
5.7.3	Western Blot	49
5.8	Messung der intrazellulären Kalzium Konzentration mittels Fura-2 AM	50
5.8.1	Ca ²⁺ -readdition Protokoll	51
5.8.2	Aktiveringung des Kalziumeinstroms über αCD3/αCD28-Aktivator-Beads	52
5.9	Kinetische Apoptosemessungen	52
5.10	Statistik	53
6	Ergebnisse	54
6.1	Optimierung der <i>in-vitro</i> Polarisierung von CD4 ⁺ Zellen in T-Zell Subtypen	54
6.2	Charakterisierung der Kalziumsignale in-vitro polarisierter CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	75
6.2.1	Messung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach Aktivierung über Thapsigargin	75
6.2.2	Quantifizierung der Expression der SOCE-Komponenten	77
6.2.3	Einfluss des Th1-polarisierenden Zytokin IL-12 auf unstimulierte CD4 ⁺ Zellen (<i>untouched</i>)	80
6.2.4	Einfluss der Spleißvariante STIM2.1 auf die differenzielle Regulation der Kalziumphänotypen der CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	81
6.2.5	Einfluss von Orai1 auf die differenzielle Regulation der Kalziumphänotypen der CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	86
6.2.6	Einfluss spannungsgesteuerter L-Typ Kalzium Kanäle (Ca _v) auf SOCE in CD4 ⁺ T-Zell Subtypen.	88
6.2.7	Charakterisierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach Aktivierung durch αCD3/αCD28 Aktivator Bead Stimulation	95
6.2.8	Untersuchung der Sensitivität des speichergesteuerten Kalziumeinstroms der CD4 ⁺ T-Zell Subtypen gegenüber Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)	100
6.3	Apoptose in CD4 ⁺ T-Zell Subtypen und die Rolle von IL-21	102
6.3.1	Differenzielle Expression von IL-21 in CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	102
6.3.2	Einfluss von IL-21 auf die Signaturzytokin Expression	103

6.3.3	Die Rolle von IL-21 in spontaner und induzierter Apoptose von CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	104
7	Diskussion	107
7.1	Etablierung und Optimierung der <i>in-vitro</i> Polarisierung humaner CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	107
7.2	Charakterisierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	111
7.2.1	CD4 ⁺ Subtypen haben charakteristische Kalziumphänotypen	111
7.2.2	Einfluss der dominant-negativen Spließvariante STIM2.1 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom von <i>in-vitro</i> polarisierten CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	118
7.2.3	Einfluss von Orai 1 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom von <i>in-vitro</i> polarisierten CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	120
7.2.4	Einfluss von spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanälen auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom von <i>in-vitro</i> polarisierten CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	122
7.2.5	ROS Sensitivität der CD4 ⁺ T-Zell Subtypen	125
7.3	Rolle von IL-21 in der Apoptosesensitivität der CD4 ⁺ T-Zellsubtypen	127
8	Ausblick	130
	Literaturverzeichnis	131
	Danksagung	147
	Publikationen	148

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englisch	Deutsch
APC	Antigen presenting cell	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammonium persulfat	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchonin acid	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine calf serum	Bovines Kälber Serum
CAD	CRAC activation domain	CRAC-Aktivierungsdomäne
Ca _v	Voltage gated calcium channel	Spannungsgesteuerter Kalziumkanal
CD	Cluster of differentiation	Differenzierungscluster
CRAC	Calcium release activated calcium	Kalziumeinstrom aktiviert durch Kalziumeinstrom
DC	Dendritic cell	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	Enhanced chemi luminescence	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FCS	Fetal calf serum	Fetales Kälber-Serum
FoxP3	Forkhead box protein 3	Forkhead box Protein 3
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	Forward scatter	Forwärtsstreulicht
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IFN- γ	Interferon- γ	Interferon- γ

IL-4	Interleukin 4	Interleukin 4
IL-17	Interleukin 17	Interleukin 17
IL-21	Interleukin 21	Interleukin 17
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphate	Inositol-1,4,5-triphosphat
mRNA	Messenger RNA	Boten RNA
mM	Milimolar	Milimolar
μM	Micromolar	Mikromolar
μm	Micrometer	Mikrometer
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Exchanger	Natrium-Kalzium-Austauscher
NFAT	Nuclear factor of activated T cells	Nucleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK Zellen	Natural killer cells	Natürliche Killer Zellen
nM	Nanomolar	Nanomolar
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	Periphere Mononukleäre-Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
PLCγ	Phospholipase C γ	Phospholipase C γ
PMCA	Plasma membrane calcium ATPase	Plasmamembran Kalzium ATPase
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer	Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RORγ-t	RAR related orphan receptor γ	RAR related orphan receptor γ
ROS	Reactive oxygen species	Reaktive Sauerstoff Spezies
RT	Room temperature	Raumtemperatur
SAM	Sterile alpha motif	Steriles Alpha-Motiv
SCID	Severe combined immunodeficiency	Schwere kombinierte Immunschwäche
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Natriumlaurylsulfat
SERCA	Sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase	Sarkoplasmatische/ endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
siRNA	Small interfering RNA	kleine eingreifende RNA

SIRS	Systemic inflammatory response syndrome	Systemisches inflammatorisches Response Syndrom
SOCE	Store operated calcium entry	Speichergesteuerter Kalzium- Einstrom
SSC	Side scatter	Seitwärtsstreulicht
STIM	stromal interaction molecule	stromaständiges Interaktionsmolekül
TCR	T cell receptor	T-Zell Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Tetramethylethylendiamin
Th	T-helper	T-Helfer
TRP	transient receptor potential cation channel	Transientes-Rezeptor- Potential-Kationen-Kanal

1 Summary

Antigen mediated stimulation of naïve CD4⁺ T cells triggers differentiation into effector regulatory or helper subtypes in a cytokine and antigen dependent manner. Imbalances between resulting subtypes can lead to an inadequate immune response or can contribute to autoimmune disease. The crucial role of Calcium in the activation and cytokine secretion of T cells is well characterized, however how the individual subtype response is shaped by differential calcium signatures or how or if alterations in the signature influence the fate of a given subtype is less clear

In this thesis, the *in-vitro* differentiation of human peripheral CD4⁺ T cells into Th1, Th2, Th17 or regulatory (Treg) T cells was optimized by alteration of the supplied cytokines and duration or intensity of the applied stimulation. Efficiency of polarization was monitored by flow cytometry and parallel to cytokine secretion or polarization, the corresponding store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) phenotype of these cells were determined by single cell Fura-2 measurements.

Calcium signals were measured after store depletion with Thapsigargin and after mimicking a more physiological stimulus using αCD3/αCD28 activator beads. Treg cells showed a higher and more sustained [Ca²⁺]_i in response to both Thapsigargin mediated store depletion and bead stimulation when compared to non-polarized cells, effector Th1, Th2 and Th17 showed a lower [Ca²⁺]_i. Notably the calcium phenotypes of Th0, Th1, Th2 and Th17 differ dependent from the applied stimulus. Nevertheless all subtypes showed substantial and significant calcium phenotypes. To investigate whether these differences are due to differential expression of the major components of SOCE we measured by qRT-PCR and Western blot the mRNA and protein expression of STIM and Orai genes and proteins. But for Treg, Th1 and control Th0 we did not find significant differences in the protein levels of Orai1, STIM1 and STIM2.

In addition IL-12 treatment alone of untouched CD4⁺ cells led to a significantly reduced SOCE and an increase in the Th1 signature transcription factor T-bet, indicating an important role of IL-12 in regulating Ca²⁺-dependent processes or components in Th1 cells. Altogether, our results point to a differential Ca²⁺ profile of effector T cells. If these profiles influence the outcome of the downstream immune response needs to be further elucidated.

Since the absolute levels of CRAC proteins Orai1, STIM1 and STIM2 do not seem to be the sole source of the differential calcium phenotypes of the *in-vitro* polarized CD4⁺ T-cell subtypes, splice variants or other channels conducting calcium may influence the observed differences.

Therefore we investigated the role of the new inhibitory splice variant STIM2.1 by siRNA approach. Interestingly, SOCE profiles of Th1 and Treg are not affected by the STIM2.1 downregulation, whereas Th2, Th17 and Th0 exhibit the already described increase of $[Ca^{2+}]_i$ after knocking down the inhibitor.

By knocking-down the CRAC Channel Orai1 we found surprising differences for regulatory T-cells, too. The down regulation of Orai1 in Th0 and Th1 leads to decreased $[Ca^{2+}]_i$, whereas in Treg the calcium signals are not negatively affected but rather increased by the siRNA based downregulation of Orai1.

Because the role of voltage gated L-type Ca_v channel on SOCE is controversially discussed, we pharmacologically influenced the L-type Ca_v channels by different blockers and measured the effect on SOCE profiles in *in-vitro* $CD4^+$ T-cell subtypes after calcium-readdition protocol and TCR engagement. We found only very slight effects of L-Type Ca_v blockers on SOCE in T-cell subtypes. In our hands these effects cannot explain the observed substantial differences in SOCE profiles of *in-vitro* polarized $CD4^+$ T-cell subtypes. Moreover we cannot rule out, that the differences are caused by an unspecific effect of Ca_v channel blockers on K^+ channels.

It is possible that other regulators that affect SOCE play a role in the differential calcium signals of *in-vitro* polarized $CD4^+$ T-cell subtypes in particular in Treg, since our data point to an alternative regulation of calcium signals in Treg .

For further characterization of SOCE in T helper subtypes, we investigated the sensitivity of SOCE against reactive oxygen species (ROS), but found that $CD4^+$ subtypes do not seem to be differentially sensitive against ROS.

In summary, we successfully established *in-vitro* polarization of human $CD4^+$ subtypes and found significant and substantial calcium phenotypic differences within the *in-vitro* polarized $CD4^+$ T-cell subtypes. The new splice variant STIM2.1 and also Orai1 might influences the calcium signals in the subtypes to a different extent, although the absolute levels of both do not seem to be different. These differences may partly but not solely explain the observed differences in calcium signals. The major factors influencing the observed phenotypes, as well as the differences in calcium signals after passive store depletions and TCR engagement need to be further elucidated.

2 Zusammenfassung

Durch Antigenkontakt über antigenpräsentierende Zellen differenzieren naive CD4⁺ Zellen zu unterschiedlichen Effektor Subtypen, T-Helfer-Zellen und regulatorische T-Zellen. Dabei ist die Balance der Subtypen kritisch für eine adäquate Immunantwort. Ist das Verhältnis zwischen den Subtypen nicht ausgeglichen, können Autoimmunerkrankungen oder ungenügende Immunantworten die Folge sein. Die kritische Rolle von Kalzium bei der T-Zell Aktivierung und Zytokinsekretion ist bekannt, während der Einfluss auf Entwicklung und Aktivierung der einzelnen CD4⁺T-Zell Subtypen weniger gut verstanden ist.

In dieser Arbeit wurde die *in-vitro* Differenzierung humaner peripherer CD4⁺ T-Zellen in die Subtypen Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen über Zytokinkonzentration und Stimulationsdauer etabliert und optimiert. Die Effizienz der Polarisierung wurde mittels durchflusszytometrischer Messung der Zytokinprofile überwacht. Parallel dazu wurde der speichergesteuerte Kalziumeinstrom (SOCE, *store operated calcium entry*) der CD4⁺ T-Zell Subtypen mittels Fura-2 AM basiertem Ca²⁺-Imaging charakterisiert.

Der speichergesteuerte Kalziumeinstrom wurden sowohl über Speicherentleerung mittels Thapsigargin als auch über die Nachahmung eines physiologischen Stimulus mittels α CD3/ α CD28 Aktivator Beads induziert. Dabei wiesen Treg verglichen mit den Subtypen Th0, Th1 und Th2 und Th17 sowohl nach Thapsigargin Stimulation als auch nach α CD3/ α CD28 Aktivator Bead Stimulation höhere und anhaltendere Kalziumsignale auf. Die T-Helfer-Subtypen Th1, Th2 und Th17 zeigten dagegen niedrigeren Einstrom von Kalzium. Interessanterweise unterschieden sich die Kalziumphänotypen von Th1, Th2 und Th17 je nach Stimulus. Allerdings wiesen alle *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen deutliche und signifikante Unterschiede in ihren Kalziumprofilen auf.

Um die Unterschiede der Kalziumphänotypen mit der Expression der CRAC Komponenten vergleichen zu können, wurde mittels qRT-PCR Messungen und Western Blot Analysen die Expression der CRAC Komponenten auf RNA und Proteinebene untersucht. Für Th0, Th1 und Treg konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Proteinlevel von Orai1, STIM1 und STIM2 gefunden werden. Auch die Expressionslevel der CRAC Komponenten auf mRNA Ebene ließen sich nicht mit den Kalziumphänotypen korrelieren.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bereits IL-12 Behandlung alleine in *untouched* CD4⁺ T-Zellen eine Reduktion von SOCE bewirkt, sowie einen Anstieg des Th1 spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet induziert. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von IL-12 in der Regulation Kalzium-abhängiger Prozesse in Th1 hin.

Zusammengenommen weisen die Daten auf differentielle Kalziumprofile von Effektor T-Zellen hin. Ob und wie die spezifischen Kalziumphänotypen die Immunantwort verändern, muss noch weiter untersucht werden.

Da die Kalziumphänotypen der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen nicht alleine durch die absoluten Mengen der CRAC Komponenten Orai1, STIM1 und STIM2 erklärt werden können, wurde die Rolle anderen Kanäle und Spleißvarianten untersucht, die die Kalziumprofile der CD4⁺ T-Zell Subtypen beeinflussen könnten.

Hierfür wurde die Rolle der neuen inhibitorischen Spleißvariante STIM2.1 mittels Herunterregulation durch siRNA untersucht. Interessanterweise waren die Kalziumsignale von Treg und Th1 nicht durch die verminderte Expression der Spleißvariante betroffen, während die Subtypen Th2, Th17 und die Kontrolle Th0 den bereits publizierten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ nach der Herunterregulation des Inhibitors zeigten. Weiterhin konnte durch eine siRNA vermittelte Herunterregulation des CRAC (*calcium release activated calcium*) Kanals Orai auch überraschende Unterschiede in Treg beobachtet werden. Th0 und Th1 zeigten die erwartete Verringerung des Kalziumsignals, während der $[Ca^{2+}]_i$ in Treg durch die siRNA Transfektion nicht negativ beeinflusst wurde.

Der Einfluss von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen (Ca_v) auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom in Lymphozyten wird kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund wurden die L-Typ Ca_v mittels pharmakologischer Substanzen blockiert und der Einfluss der Inhibition auf SOCE gemessen. Dabei konnten nur sehr moderate Effekte auf SOCE festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die signifikanten Kalziumphänotypen der *in vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen nicht durch eine differentielle Regulation über L-Typ Ca_v erklären lassen.

Um die Kalziumprofile der *in vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen genauer zu charakterisieren, wurde außerdem die Sensitivität von SOCE gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) untersucht. Anhand der gemessenen Daten konnte jedoch keine differentielle Sensitivität der CD4⁺ Subtypen gegenüber ROS festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die *in vitro* Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zell Subtypen etabliert werden, welche signifikante Kalziumphänotypen aufweisen.

Möglicherweise beeinflussen die neue inhibitorische Spleißvariante STIM2.1 und der CRAC Kanal Orai1 die Kalziumprofile der Subtypen zu einem unterschiedlichen Grad. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Effekt von Orai1 und STIM2.1 kein ubiquitärer Effekt, sondern möglicherweise zellspezifisch sein könnte und sich in den Subtypen grundlegend unterscheidet. Dieser differentielle Einfluss der verschiedenen CRAC Komponenten könnte die Kalziumphänotypen teilweise erklären. Welche weiteren Faktoren für das Zustandekommen der unterschiedlichen Kalziumprofile innerhalb der CD4⁺

Subpopulationen verantwortlich sind, kann auf Basis dieser Arbeit in Zukunft noch weiter untersucht werden.

3 Einleitung

“The microorganisms that seem to have it in for us in the worst way - the ones that really appear to wish us ill - turn out on close examination to be rather more like bystanders, strays, strangers in from the cold. They will invade and replicate if given the chance, and some of them will get into our deepest tissues and set forth in the blood, but it is our response to their presence that makes the disease. Our arsenals for fighting off bacteria are so powerful, and involve so many different defense mechanisms, that we are more in danger from them than from invaders.

We live in the midst of explosive devices; we are mined.”

Lewis Thomas, New England Journal of Medicine (1972; 287:553-555)

3.1 Die Aufgaben des Immunsystems

Das schnell wirkende, angeborene Immunsystem und das langsamere, adaptive Immunsystem bilden einen effektiven Abwehrmechanismus gegen Pathogene. Das Zusammengreifen der inerten Abwehr durch Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK), Dendritische Zellen (DC) und die spezifischere Abwehr mit B- und T-Zellen gewährleistet einen komplexen Schutzmechanismus (Janeway & Medzhitov 2002).

Die Funktionen eines intakten Immunsystems lassen sich in vier Hauptaufgaben unterteilen: Zum einen müssen Pathogene immunologisch erkannt werden. Die Einordnung als „körperfremd“ verläuft über die Erkennung von Peptidfragmenten der Pathogene, welche von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden, die diese über MHC-Moleküle (Majorhistocompatibility complex) an ihrer Oberfläche präsentieren. Diese Komplexe werden von Leukozyten des angeborenen Immunsystems (Neutrophile Zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen) und den Lymphozyten des adaptiven Immunsystems erkannt. Die nächste wichtige Aufgabe ist die Pathogen Abwehr über die Immuneffektorfunktionen. Diese werden durch das Komplementsystem (Blutproteine, die die Funktion der Antikörper verstärken) sowie zytotoxischen Lymphozyten (natürliche Killerzellen und T-Killerzellen) getragen. Damit die Immunantwort keine Schäden an körpereigenen Zellen verursacht, muss das Immunsystem in der Lage sein, sich nach erfolgter Pathogen Vernichtung wieder abzuschalten. Aus diesem Grund ist die Immunregulation wichtiger

Bestandteil eines funktionierenden Immunsystems. Ist die Immunregulation nicht intakt, können Allergien oder Autoimmunerkrankungen entstehen. Auf zellulärer Ebene wird die Regulation der Immunantwort unter anderem von regulatorischen T-Zellen ausgeführt.

Eine weitere Aufgabe ist die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, ein spezifisches Merkmal der adaptiven Immunantwort. Nach erfolgreicher Bekämpfung des Pathogens entstehen aus B- und T-Zellen durch klonale Selektion Gedächtniszellen, spezifisch für ein bestimmtes Antigen. Eine Zweitinfektion kann so schneller und wirkungsvoller bekämpft werden, da die adaptive Immunantwort direkt einsetzt und sich nicht wie bei der Erstinfektion zunächst bilden muss (Murphy et al. 2009).

CD4⁺ T-Zellen sind an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt und modulieren sowie induzieren viele dieser vier Aufgaben. Sie werden durch Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen aktiviert und leiten dadurch eine spezifische Immunantwort ein. Das bedeutet sie produzieren Zytokine, aktivieren Makrophagen sowie B-Zellen und induzieren damit die Produktion spezifischer Antikörper. Sie bilden das immunologische Gedächtnis, indem sie als T-Gedächtniszellen nach Infektbekämpfung im Körper verbleiben. Außerdem sind sie durch iTreg (induzierbare regulatorische T-Zellen) an der Immunregulation beteiligt (Zhu et al. 2010).

3.2 Die Entwicklung der T-Zellen

Die T-Zell Reifung findet im Thymus statt. Vorläuferzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC) wandern vom Knochenmark in den Thymus. Dort durchlaufen die Zellen drei verschiedene Entwicklungsstadien, doppelt negativ (DN), doppelt positiv (DP) und einfach positiv (*single positive*, SP) für CD4 bzw. CD8. Nachdem die Vorläuferzellen den Thymus erreicht haben beginnen sie CD44 zu exprimieren und werden damit zu DN Zellen. In diesem Stadium beginnt die Entwicklung des für jede Zelle einzigartigen T-Zell-Rezeptors über Rekombination des Gen der TCR β -Kette. Nach Rekombination wird die Kette zusammen mit der prä- α Kette und CD3 exprimiert. Dieser Prozess wird als β -Selektion bezeichnet, da alle Zellen, die nicht in der Lage sind die β -Kette, den variablen Teil des TCR, zu exprimieren in Apoptose gehen. (Ma et al. 2013). Nach erfolgreicher β -Selektion und vorheriger Neuordnung der α Kette besitzen die DN Zellen einen funktionsfähigen $\alpha\beta$ TCR und beginnen CD4 und CD8 zu exprimieren. Damit werden sie zu doppelt positiven (DP) Zellen. Als nächstes durchlaufen die DP Zellen die Positivselektion. Kortikale Epithelialzellen oder Dendritische Zellen präsentieren MHC Moleküle. Nur DP Zellen, die über den TCR an MHC I oder MHC II binden und dabei eine moderate Stimulation durchlaufen, überleben den Test auf MHC Restriktion. Die DP Zellen, die mit keiner oder inadäquater Stimulation reagieren, gehen in Apoptose. Dieser Prozess wird *death by neglect* genannt.

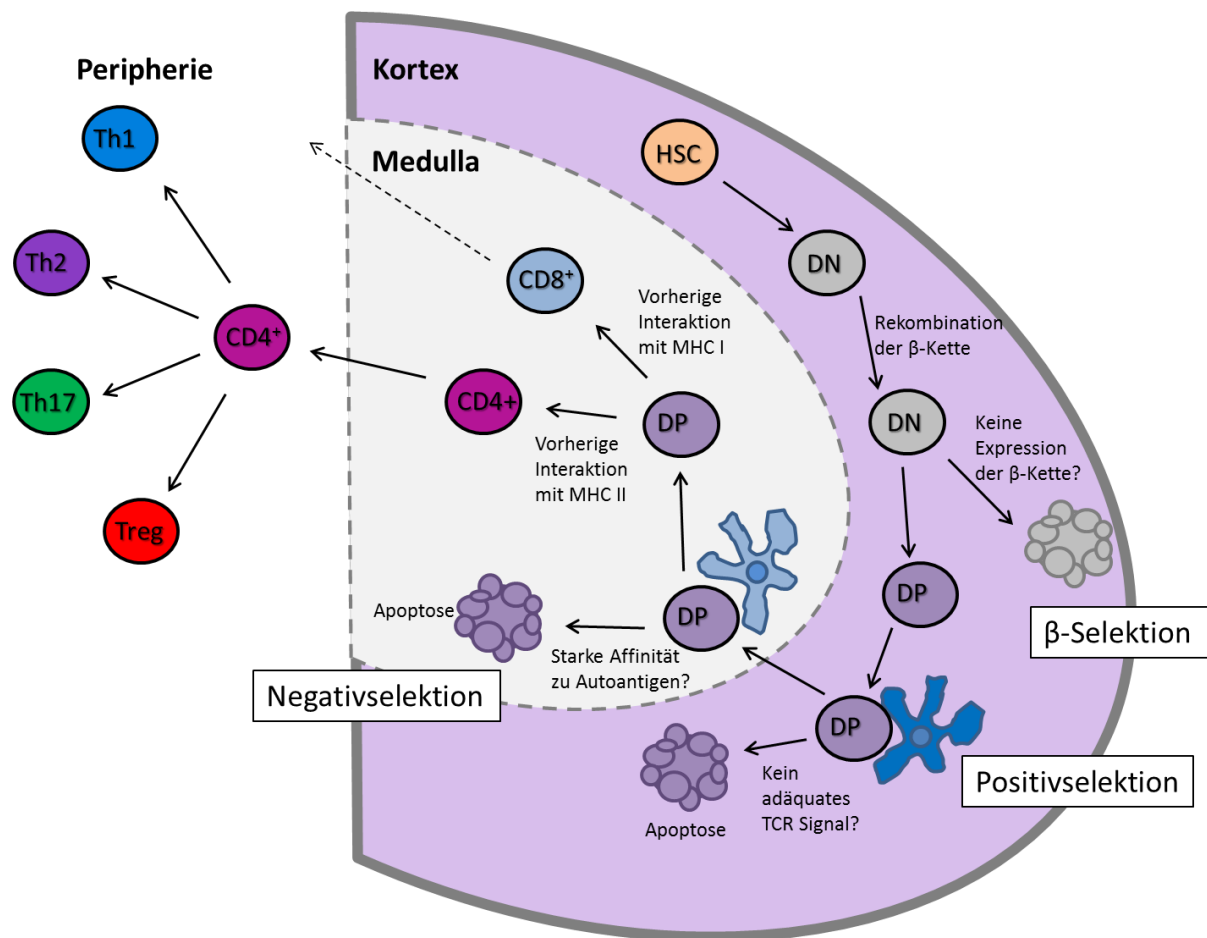


Abbildung 1: Hämatopoetische Stammzellen wandern vom Knochenmark in den Thymus: Dort entstehen doppeltnegative Zellen ($CD4^-/CD8^-$). Durch Rekombination entsteht der variable Teil der β -Kette. Expressieren die DN Zellen die β -Kette bestehen sie die β -Selektion, schlägt die Expression fehl, gehen sie in Apoptose. Die DP Zellen expressieren den TCR und sowohl CD4 als auch CD8 ($CD4^+/CD8^+$). Bei der Positivselektion wird auf ein adäquates TCR Signal getestet. Binden die DN nicht an MHC I oder MHC II gehen sie in Apoptose. Die Negativselektion findet in der Medulla statt. Hier wird nach zu starker Autoaffinität selektiert. Die DP Zellen, die die Negativselektion überstehen, beginnen je nach MHC Molekül Kontakt während der Positivselektion CD4 oder CD8 herunter zu regulieren und werden zu einfachpositiven Zellen (SP, $CD4^+CD8^-$ oder $CD4^+CD8^+$). Die reifen $CD4^+$ Zellen wandern aus dem Thymus in die Peripherie, wo sie nach Antigenkontakt zu Effektor Zellen reifen (Figur modifiziert nach Germain 2002)

Nach der Positivselektion wandern die DP Zellen in die Medulla. Dort unterlaufen sie der Negativselektion. In der Medulla präsentieren dendritische Zellen Autoantigene über den MHC Komplex. Zellen, die mit zu starker Affinität an Autoantigene binden, bekommen ein Todessignal und gehen in Apoptose. Dieser Schritt sortiert potentielle autoreaktive T-Zellen aus. Der letzte Schritt der T-Zell Reifung ist die Differenzierung in einfach positive Zellen (SP)(Ma et al. 2013). Dabei stellen die Zellen, die bei der Positivselektion mit MHC II interagiert haben, die Expression von CD8 ein und werden zu $CD4^+$ Zellen. Die Interaktion mit MHC I lässt die Zellen zu $CD8^+$ Zellen reifen (Neumann 2008). SP Zellen expressieren CD62 Ligand. Nach 12 Tagen migrieren die reifen T-Zellen aus dem Thymus. (Ma et al.

2013). Nur 2-3 % der täglich produzierten 50 Millionen Thymozyten werden zu reifen CD4⁺/CD8⁺ Zellen (Neumann 2008).

3.3 Die Helfer des Immunsystems, die CD4⁺ T-Zell Subtypen

In der Peripherie patrouillieren die naiven T-Zellen zwischen Blut und Lymphknoten. Für die Einwanderung in Letzteren benötigen sie die Marker CD62 Ligand (Bradley et al. 1994) und CCRX7 (Förster et al. 1999). Identifiziert werden sie außerdem über die Tyrosinphosphatase CD45, die den Threshold für die T-Zell Aktivierung beeinflusst (Hermiston et al. 2003). Humane naive CD4⁺ Zellen exprimieren nur die lange Isoform CD45 RA, Memory Zellen nur die kurze Isoform CD45RO (Clement 1992).

Nach Antigenkontakt, präsentiert durch den MHC II Komplex antigenpräsentierender Zellen, differenzieren naive CD4⁺ Zellen zu den T-Helfer Subtypen. Als wichtiger Teil des adaptiven Immunsystems beeinflussen sie die Antwort von CD8⁺ Zellen und die Funktion von Makrophagen, sowie die Antikörperproduktion in B-Zellen (Zhu et al. 2010). Außerdem sind sie der Träger des lebenslangen immunologischen Gedächtnisses. Nach einer Zweitinfektion sind Memory Zellen in der Lage schneller und effektiver auf das Pathogen zu reagieren (Sallusto et al. 2004). Am besten untersucht sind T-Helfer 1 (Th1), T-Helfer 2 (Th2), T-Helfer 17 (Th17) und induzierbare regulatorische T-Zellen (iTreg) (Yamane & Paul 2013). Alle Subtypen produzieren bestimmte Signaturzytokine und Subtyp-spezifische Transkriptionsfaktoren. Das Schicksal der Subtypen wird durch das Zytokinmilieu bestimmt (Zhu et al. 2010; Yamane & Paul 2013), welches sowohl durch die Zytokin-produzierenden Subtypen selbst, als auch durch andere Zellen wie CD8⁺ Zellen, Makrophagen, Monozyten und natürliche Killerzellen beeinflusst wird (Akdis et al. 2011). Aber auch Art und Stärke des Aktivierungsstimulus spielen eine wichtige Rolle (Constant & Bottomly 1997; Leitenberg & Bottomly 1999; Badou et al. 2001; Purvis et al. 2010; Yamane & Paul 2013; Van Panhuys et al. 2014).

3.3.1 Die Entdeckung der CD4⁺ T- Zellsubtypen: Th1 und Th2

Die CD4⁺ Subtypen Th1 und Th2 wurden 1986 von Mosmann und Kollegen aus der Coffman Gruppe erstmals beschrieben. Die Subtypen aus murinen T-Zell Klonen unterschieden sich in ihrer Zytokinproduktion, waren aber beide in der Lage B-Zell Antworten zu aktivieren. Es wurde festgestellt, dass Th1 IFN- γ produzieren, aber auch IL-2. Bei IL-2 handelt es sich aber um ein Zytokin, welches von allen T-Helfer-Zellen nach Aktivierung produziert wird und deshalb nicht zur Identifizierung einzelner Subtypen verwendet wird. Th2 produzieren IL-4 und weniger IL-2 als Th1 Zellen.

Th1 werden auch heute noch über das Signaturzytokin IFN γ definiert, dessen Produktion der Signaturtranskriptionsfaktor T-bet steuert (Szabo et al. 2000). Die *in-vitro* Polarisierung von Th1 wird über IL-12, IFN- γ und der Neutralisierung von IL-4 mit α -IL-4 induziert, dabei ist IFN γ allein nicht ausreichend für die Polarisierung in Th1 (Hsieh et al. 1993). Dagegen ist in Th2 das Signaturzytokin IL-4 auch gleichzeitig Aktivator. Zusammen mit IL-2 ist es nötig, um Th2 *in-vitro* zu polarisieren (Le Gros et al. 1990; Swain et al. 1990; Seder et al. 1992; Hsieh et al. 1992). Die Expression von IL-4 reguliert der Transkriptionsfaktor GATA-3 (Zheng & Flavell 1997; Lantelme et al. 2001). Th1 und Th2 unterscheiden sich nicht nur in der Expression und Produktion von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen, auch die Funktionen sind andere. Th1 aktivieren Makrophagen über IFN- γ Ausschüttung und sind in die Antwort auf intrazelluläre Pathogene involviert. Außerdem sind sie mit Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis assoziiert. Th2 bekämpfen extrazelluläre Parasiten und spielen eine wichtige Rolle bei Asthma und Allergien (Zhu & Paul 2008).

3.3.2 T-Helfer 17 (Th17)

Fast zwei Jahrzehnte nach der Beschreibung von Th1 und Th2 wurde ein weiterer IL17 produzierender CD4⁺ Subtyp identifiziert (Aggarwal et al. 2003; Park et al. 2005), genannt Th17 (Harrington et al. 2005). Welche Faktoren für die *in-vitro* Polarisierung humaner Th17 notwendig sind, wird immer noch debattiert. Bei CD4⁺ Zellen aus Mäusen reichen IL-6 und TGF- β aus, um Th17 zu generieren (Veldhoen et al. 2006). Humane Th17 scheinen zusätzlich IL-23 und IL-1 β zu benötigen (Wilson et al. 2007; Acosta-Rodriguez et al. 2007; Ganjalikhani Hakemi et al. 2011). Dabei ist noch nicht geklärt, ob IL-23 auch für die Induktion der Th17 Polarisierung oder nur für die Aufrechterhaltung des Phänotyps notwendig ist (Harrington et al. 2005; Park et al. 2005; Veldhoen et al. 2006; Bettelli et al. 2006; Purvis et al. 2010; Ganjalikhani Hakemi et al. 2011). In Th1, Th2 und Treg ist IL-2 ein essentieller Faktor für die Polarisierung. In Th17 ist dies nicht der Fall. Der für Treg und auch Th17 benötigte *Transforming growth factor β* (TGF β) aktiviert im Zusammenspiel mit IL-2 die Produktion des Transkriptionsfaktor FoxP3 (*Forkhead box protein 3*) (Zheng et al. 2007) und inhibiert die IL-17 Produktion (Stockinger 2007; Wilson et al. 2007).

Ein weiterer kritischer Faktor für die *in-vitro* Polarisierung von Th17 Zellen ist die Stimulationsstärke über den TCR. Diese beeinflusst die Fähigkeit der T-Zellen IL-17 zu produzieren. Dabei wurde herausgefunden, dass trotz IL-17 fördernder Zytokinumgebung, eine starke Stimulation des TCR die Produktion von IL-17 unterdrückt. Ein schwacher Stimulus fördert dagegen die IL-17 Produktion (Purvis et al. 2010).

Die Expression des Signaturzytokins IL-17 wird von dem Transkriptionsfaktor ROR γ t (*RAR related orphan receptor γ*) geregelt (Ivanov et al. 2006).

In-vivo leiten Th17 die Immunantwort bei extrazellulären Bakterien und Pilzen. Außerdem spielen sie eine Rolle in einigen organspezifischen Autoimmunerkrankheiten (Zhu & Paul 2008).

3.3.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Autoimmunität entsteht durch den Zusammenbruch der Selbsttoleranz. Regulatorische T-Zellen sind wichtig für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und stoppen die Immunantwort. Die Aufgabe der Treg ist somit im Gegensatz zu den T Helfer-Zellen nicht proinflammatorisch, sondern regulatorisch. (Zhu & Paul 2008). Sie supprimieren die Immunantwort durch Zell-Zell-Interaktion mit dendritischen Zellen und unterbrechen den Metabolismus von Effektorzellen. Außerdem sekretieren sie zytotoxisches Granzym B sowie inhibitorische Zytokine wie IL-10 (Schmitt & Williams 2013)

Regulatorische T-Zellen sind über die Expression des Oberflächenmarkers CD25 und den Signaturtranskriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert. Mitte der 90er Jahre wurde erstmals ein im Thymus gebildeter CD4⁺CD25⁺ Subtyp beschrieben, dessen Fehlen einen Autoimmunphänotyp auslöst (Sakaguchi et al. 1995; Asano et al. 1996). Im Jahr 2001 wurde entdeckt, dass FoxP3 spezifisch für Treg ist (Brunkow et al. 2001). FoxP3 ist unabdingbar für die Bildung regulatorischer T-Zellen. Patienten mit Mutationen im FoxP3 Gen weisen keine CD25⁺ Zellen auf und leiden an einer schweren Autoimmunerkrankung, genannt IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), die multiple Organe betrifft. Lymphoproliferation, Diabetes, exfoliative Dermatitis, Thyroiditis und Enteropathie sind die Folge. Diese Krankheit ist äquivalent zu Maus Mutante „*scurfy*“ (Chatila et al. 2000; Brunkow et al. 2001; Wildin et al. 2001; Bennett et al. 2001). Es existieren zwei Varianten von FoxP3⁺ Zellen: natürliche Treg (nTreg) aus dem Thymus, auch genannt Thymus Treg (tTreg) und induzierbare Treg (iTreg) (Stephens et al. 2001; Sekiya et al. 2016). Letztere entstehen aus naiven CD4⁺ Zellen in der Peripherie und *in-vitro* durch die Aktivierung in der Gegenwart von TGF- β und IL-2 (Chen et al. 2003; Zheng et al. 2004; Fu et al. 2004). Beide unterscheiden sich nicht in ihrer Funktion, wobei nTreg stabiler sind. Außerdem ist ihr TCR Repertoire stärker auf Autoantigene ausgerichtet, wodurch sie bei der Unterdrückung von Autoimmunität eine wichtige Rolle spielen (Sekiya et al. 2016). Auch nach *in-vitro* Restimulation ohne TGF- β behalten nTreg ihren Suppressor Phänotyp, stabilisiert durch epigenetische Modifikation des *FoxP3* Locus, der in iTreg nur unvollständig methyliert ist (Floess et al. 2007). iTreg treten verstärkt in bestimmten Organen wie dem Darm auf und sind wichtig für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegen Bakterien, Nahrungsmittel und Allergene (Sekiya et al. 2016). Alles in allem scheinen die Funktionen

von iTreg und nTreg nicht redundant sondern synergistisch zu sein. Sie exprimieren ein unterschiedliches Repertoire an TCR und erkennen verschiedene Antigene. Außerdem wurde gezeigt, dass nTreg und iTreg nur im Zusammenspiel in der Lage sind einen umfassenden Schutz gegen Lymphoproliferation, Autoimmunität und chronischer Inflammation aufrechtzuerhalten (Haribhai et al. 2011; Bilate & Lafaille 2011).

Es ist bekannt, dass FoxP3 im Zusammenhang mit Kalzium-assoziierten Prozessen steht. Die FoxP3 Produktion ist abhängig vom Transkriptionsfaktor NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) (Y. Wu et al. 2006; Tone et al. 2008; Müller & Rao 2010) und STIM1 (Desvignes et al. 2015), dem Aktivator des speichergesteuerten Kalziumeinstroms.

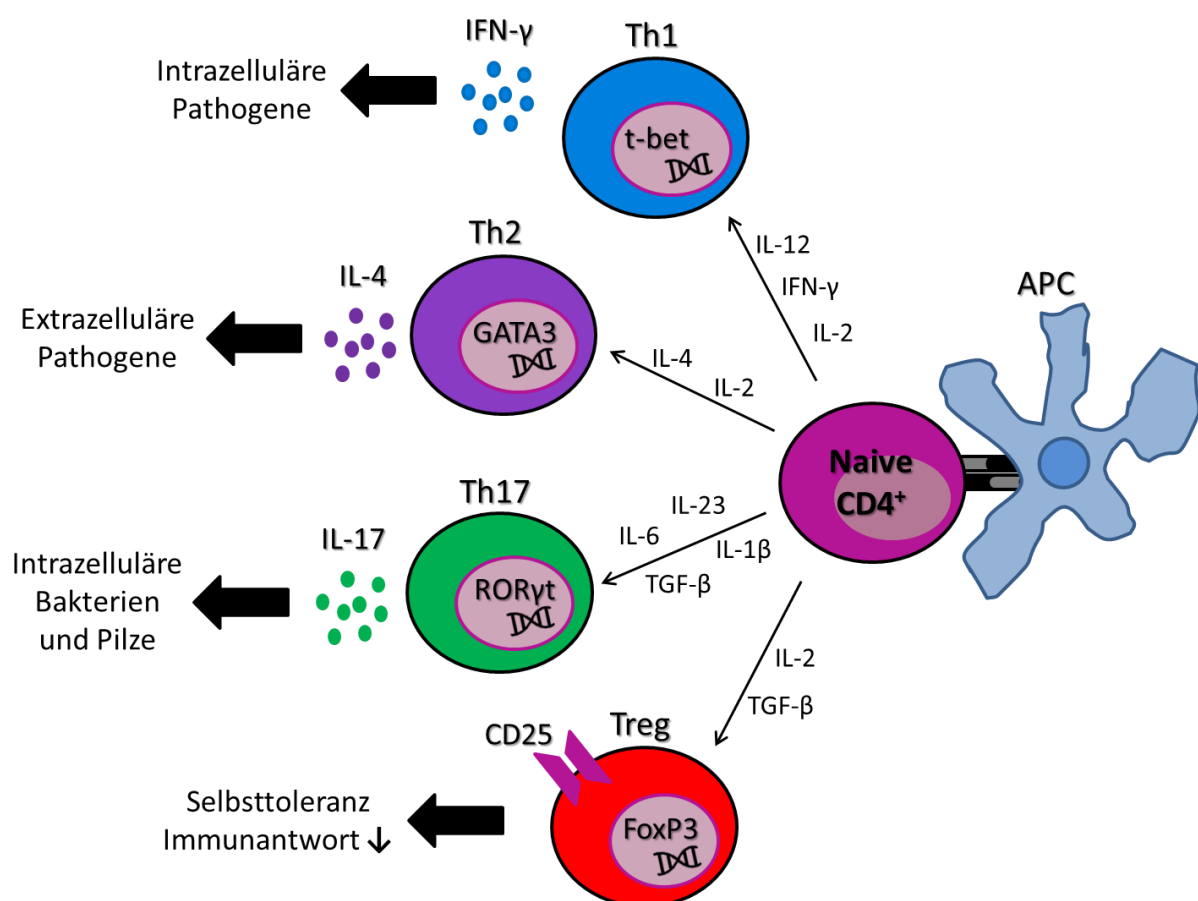


Abbildung 2: Übersicht CD4⁺ T-Zell Subtypen. Nach Aktivierung des TCR über den MHC Komplex einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) werden naive T-Zellen in die CD4⁺ Effektor Subtypen polarisiert. Th1 benötigen IL-12, IFN-γ und IL-2 zur Differenzierung. Danach produzieren sie ihr Signaturzytokin IFN-γ, kontrolliert durch den Transkriptionsfaktor T-bet. Die Aufgabe von Th1 ist die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene. Th2 werden durch IL-4 und IL-2 polarisiert. Sie produzieren ihr Signaturzytokin IL-4 und den Transkriptionsfaktor GATA3. Th2 richten sich gegen extrazelluläre Pathogene. Die Th17 Polarisation verläuft über TGF-β, IL-6, IL-23 und IL-1β. Das Signaturzytokin IL-17 wird durch den Transkriptionsfaktor RORγt kontrolliert. Th17 bekämpfen intrazelluläre Bakterien und Pilze. Regulatorische T-Zellen (Treg) werden in Anwesenheit von IL-2 und TGF-β polarisiert. Sie produzieren den Signatur Transkriptionsfaktor FoxP3 und das Oberflächenmolekül CD25. Sie wirken anti-inflammatorisch, supprimieren die Immunantwort und regeln die Selbsttoleranz.

3.3.4 *In-vitro* Polarisierung von CD4⁺ T-Zell Subtypen

Um die human CD4⁺ T-Zell Subtypen genauer zu charakterisieren werden die Subtypen *in-vitro* polarisiert. Dadurch ist es möglich, größere Mengen an humanen Subtypen zu generieren. Es wird versucht, die physiologischen Bedingungen über Zytokinmilieu, neutralisierende Antikörper und Aktivierung des T-Zell Rezeptors über α CD3/ α CD28 Beads zu imitieren, um die Expression der Signaturtranskriptionsfaktoren zu induzieren, die die Differenzierung der CD4⁺ Zellen in den gewünschten Subtyp bestimmen. Durch die Veränderung der Signaturzytokinproduktion bzw. des Signaturtranskriptionsfaktors lässt sich die Effizienz der Polarisierung eines bestimmten Subtyps überwachen. Trotz allem, bleibt dieses System nur ein artifizielles Modell, da die Signale, welche die Polarisierung *in-vivo* steuern, nur teilweise nachgebildet werden können. (Geginat et al. 2013). Mit der *in-vitro* Polarisierung sollte eine bestmögliche Annäherung an die humanen Subtypen *in-vivo* erreicht werden.

3.4 IL-21, ein Zytokin mit vielen unterschiedlichen Aufgaben

IL-21 wurde bei einem Screen für den bereits entdeckten IL-21 Rezeptor identifiziert (Parrish-Novak et al. 2000). Es ist 131 Aminosäuren lang, besteht aus 4 α Helices und hat Strukturähnlichkeiten mit IL-2 und IL-4 (Bondensgaard et al. 2007).

IL-21 wird hauptsächlich von natürlichen Killerzellen, CD4⁺ Zellen und CD8⁺ Zellen produziert. Innerhalb der CD4⁺ Population sind Th17 die größten Produzenten von IL-21. Die Expression des IL-21R ist weit verbreitet, IL-21 hat damit eine Wirkung auf viele verschiedene Zelltypen wie dendritische Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Epithelial Zellen, natürliche Killerzellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen (Spolski & Leonard 2014).

Nach Bindung von IL-21 an den IL21 Rezeptor können mehrere Signalkaskaden angestoßen werden, beispielsweise die Janus Kinase (JAK) 1 und 3. Die Aktivierung von JAK resultiert in der Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT (*signal transducer and of activator transcription*), mit einer stärkeren Wirkung auf STAT3 als auf STAT1 und STAT5a/b. Aber auch der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) sowie der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweg kann durch IL-21 aktiviert werden. Diese Komplexität könnte eine Erklärung für die im Folgenden beschriebenen pleiotrophen und auch teilweise divergenten Wirkungen des Zytokins innerhalb eines Zelltyps liefern (Spolski & Leonard 2014).

In B-Zellen beeinflusst IL-21 die Immunglobulin-Produktion und ist nötig für die Differenzierung. In IL-21^{-/-} Zellen wird die IgE Produktion verstärkt und die IgG1 Produktion verringert (Ozaki et al. 2002). Gleichzeitig kann IL-21 sowohl Proliferation als auch Apoptose in B-Zellen auslösen, anhängig vom Aktivierungsstimulus der B-Zelle (Parrish-Novak et al.

2000; Mehta et al. 2003; Jin et al. 2004). In dendritischen Zellen inhibiert IL-21 die Aktivierung und vermindert auch die T-Zell Antwort, die durch IL-21 behandelte DCs ausgelöst wird (Brandt et al. 2003). In CD8⁺ T-Zellen bewirkt IL-21 in Kombination mit CD3 Stimulation und IL-2/IL-15 Proliferation (Parrish-Novak et al. 2000). Welche Rolle IL-21 in CD4⁺ T-Zellen spielt, wurde noch nicht vollständig geklärt. IL-21 unterstützt die *in-vitro* Polarisierung von CD4⁺ Zellen zu Th17 (Ivanov et al. 2007; Sonderegger et al. 2008), IL-21^{-/-} Mäuse zeigen jedoch einen normalen Th17 Phänotyp und der Verlauf von Autoimmunenzephalomyelitis ist nicht beeinflusst (Coquet et al. 2008; Sonderegger et al. 2008). In CD4⁺ kann IL-21 sowohl proinflammatorisch als auch regulatorisch wirken. IL-21 inhibiert die FoxP3 Produktion und IL21^{-/-} Mäuse weisen mehr regulatorische T-Zellen auf (Korn et al. 2007; Bucher et al. 2009), aber gleichzeitig kann IL-21 auch die IL-10 Produktion in naive CD4⁺ und CD8⁺ und aktivieren (Spolski et al. 2009), welches immun suppressiv wirkt (Akdis et al. 2011). Bei *in-vitro* polarisierten Th1 und Th17, die in Anwesenheit von IL-21 differenziert wurden, konnte ebenfalls ein Anstieg der IL-10 Produktionen gemessen werden (Spolski et al. 2009). Trotzdem wird vermutet, dass IL-21 eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielt, da in Erkrankungen wie Lupus erythematoses, Psoriasis, Rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose erhöhte IL-21 Level gefunden wurden (Gharibi et al. 2016). Durch die Hinweise in der Literatur auf eine Assoziation von IL-21 und CD4⁺ Subtypen in verschiedensten Autoimmunerkrankungen wurde dieser Zusammenhang in der folgenden Arbeit genauer beleuchtet. Es wurde untersucht, ob IL-21 möglicherweise eine Beeinflussung der Apoptosesensitivität von bestimmten CD4⁺ T-Zellsubtypen bewirkt und folglich die Balance zwischen Immunität und Immuntoleranz beeinflussen könnte.

3.5 Kalzium

Kalzium ist essentiell für viele biologische Prozesse und ein wichtiger *second messenger*. Aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede zwischen Zytosol und extrazellulär Raum ist Kalzium prädestiniert für diese Aufgabe. Während außerhalb der Zelle eine physiologische Konzentration von 1 mM Kalzium vorherrscht, liegt die Konzentration innerhalb der Zelle bei 50-100 nM, ein 10 000 bis 20 000-facher Gradient. Auch zwischen Zytosol und Endoplasmatischem Retikulum, dem intrazellulären Kalziumspeicher, herrscht mit einem 10 000-5000-fachen Konzentrationsunterschied ein enormes Konzentrationsgefälle. Die Zelle wendet große Energie auf, um diese Kalziumkonzentrationsgefälle aufrecht zu erhalten. Die Plasmamembran Kalzium ATPase (*Plasma membrane Ca²⁺-ATPase* (PMCA)) und die Sarco-Endoplasmatische Kalzium ATPase (*sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA)) pumpen Kalzium aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum bzw. ins ER-Lumen. Der mitochondriale Kalzium Uniporter

MCU (*Mitochondrial calcium uniporter*) sorgt für die Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien. Der Natrium Kalzium Antiporter tauscht Kalzium gegen Natrium über alle drei Membranen: Plasmamembran, Mitochondrienmembran und ER-Membran. Initial nutzte die Zelle diese Mechanismen vermutlich zum Ausschluss von Kalzium aus dem Zytoplasma, da Kalzium sehr stark Wasser bindet, Phosphat präzipitiert sowie Proteinkonformationen beeinflusst. Da Kalzium nicht chemisch verändert werden kann, musste es durch Kompartimentierung oder Komplexbildung sichergestellt werden. Mittlerweile dient dieser Mechanismus zur Signaltransduktion. Durch die enormen Konzentrationsunterschiede ist es möglich, schnelle und effektive Kalziumantworten auszulösen (Clapham 2007; Hogan et al. 2010).

3.6 Speichergesteuerter Kalziumeinstrom

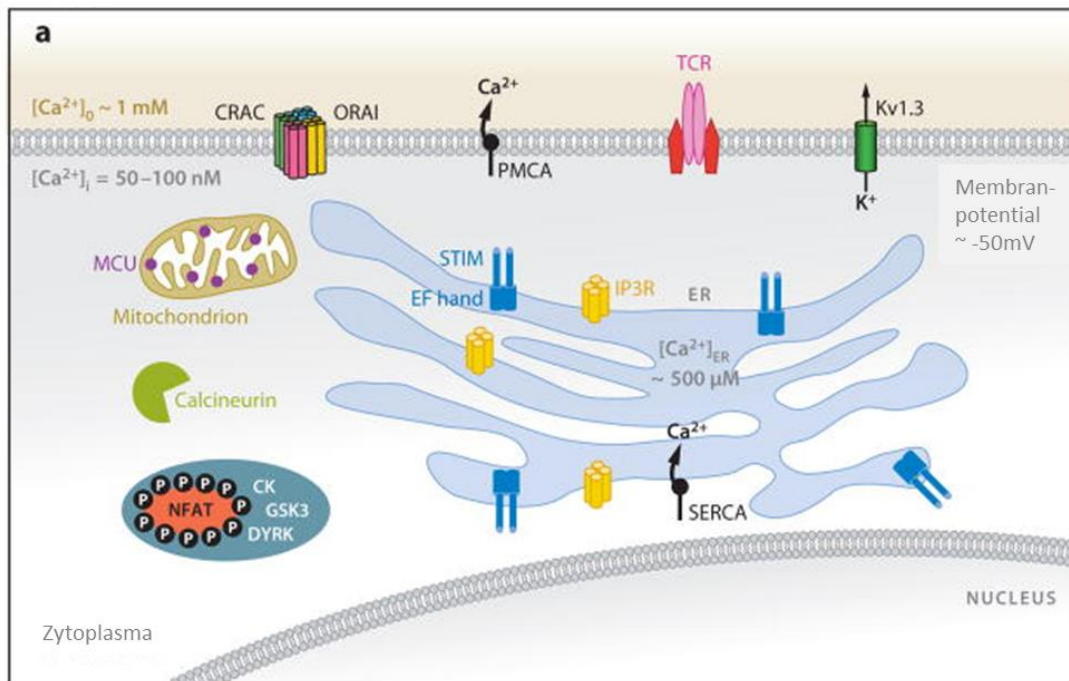
In nicht erregbaren Zellen, wie die Zellen des peripheren Immunsystems, wird Kalzium sowohl für kurzfristige als auch für langfristige Prozesse, die transkriptionelle Veränderungen beinhalten, benötigt. Erstere laufen in Minuten ab, letztere benötigen Stunde bis Tage.

In T-Zellen und anderen Immunzellen werden die Kalziumsignale hauptsächlich über den speichergesteuerten Kalziumeinstrom getragen (Prakriya & Lewis 2015). 1986 postulierte Putney, dass durch die Speicherentleerung der Einstrom von Kalzium über die Plasmamembran ausgelöst wird (Putney 1986). Dieser Kalzium-selektive Strom mit geringer Leitfähigkeit, genannt iCRAC (*Calcium release activated calcium*), wurde 1992 von Hoth & Penner in Mastzellen und 1993 von Zweifach & Lewis in Jurkat T-Zellen charakterisiert. Erst einige Jahre später konnten die molekularen Mechanismen des speichergesteuerten Kalziumeinstroms identifiziert werden. Der Durchbruch kam mit der Identifizierung der beiden wichtigsten Komponenten, dem Aktivatormolekül STIM (Stromal interaction molekül) (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005) und dem Kalziumkanal-formenden Molekül Orai1 (Feske et al. 2006; Vig et al. 2006; Zhang et al. 2006). Letzteres wurde nach den Wächtern der Himmelspforte aus der griechischen Mythologie, den Orai, benannt (Feske et al. 2006).

Mittlerweile ist bekannt, dass durch die Interaktion des T-Zell Rezeptors (TCR, T-cell receptor) mit einer antigenpräsentierenden Zelle die Phospholipase C γ (PLC γ) aktiviert wird. Diese spaltet PIP₂ in IP₃ und DAG. IP₃ bindet an den IP₃Rezeptor (IP₃R) in der ER-Membran und es kommt zur Entleerung der intrazellulären ER Kalzium Speicher. Das Aktivatormolekül STIM erkennt das Sinken der Kalziumkonzentration im ER über die Dissoziation von Kalzium von der EF-Hand des STIM Moleküls. Dies führt zu einer Konformationsänderung, was die Oligomerisierung mehrerer STIM Moleküle in sogenannte Puncta sowie die Translokation in ER-Plasmamembran nahe Regionen initiiert (Hogan et al. 2010; Prakriya & Lewis 2015). Dort interagiert Stim physikalisch mit dem Kanalporen-formenden Protein Orai, was in einem

Kalziumeinstrom in die Zelle resultiert (Park et al. 2009; Zhou et al. 2010; Soboloff et al. 2011).

Ruhende Zelle



Aktivierte Zelle

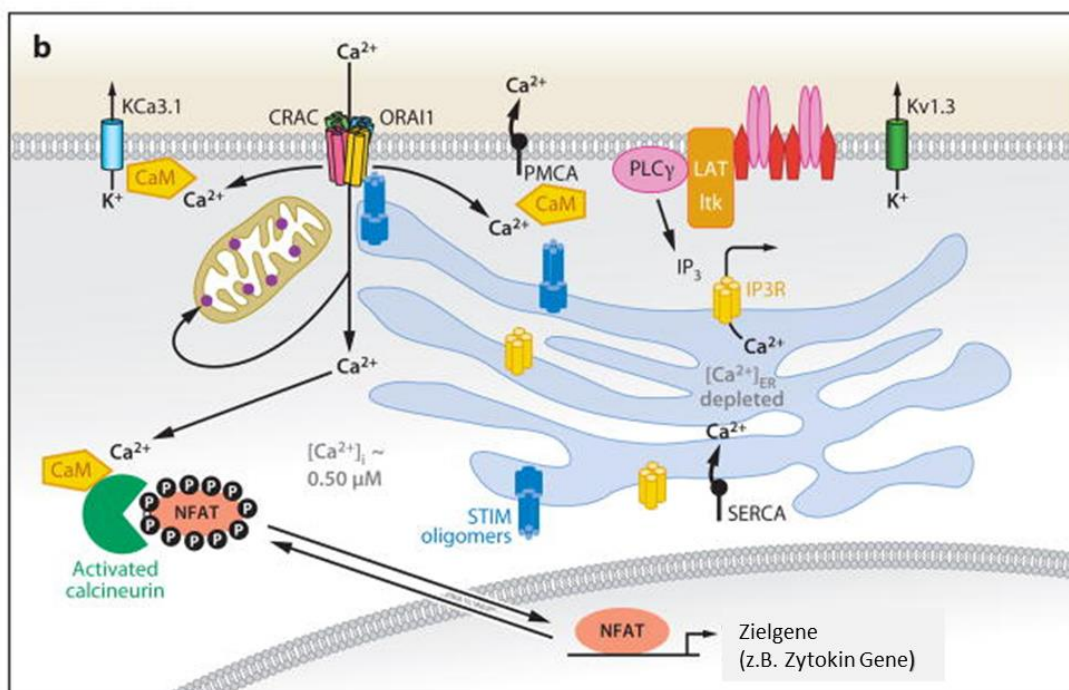


Abbildung 3: Übersicht über die Folgen der TCR Aktivierung in T-Zellen. a: Ruhende T-Zelle: Das Membranpotential einer inaktiven, nicht erregbaren Zelle liegt bei ungefähr -50mV. Das Potential wird hauptsächlich über spannungsabhängige Kalium Kanäle aufrechterhalten (K_V 1.3). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration liegt zwischen 50 und 100nM, aufrechterhalten von PMCA und SERCA sowie NCX und MCU. Die Kalziumkonzentration im ER liegt bei circa 500 µM, was zur einer Sättigung der EF Hand von STIM führt und Stim nicht oligomerisiert vorliegt. In der inaktiven phosphorylierten Form befindet sich der Transkriptionsfaktor NFAT im Zytoplasma. b: Aktivierte T-Zelle: Nach Aktivierung des TCR findet sich ein Signalkomplex bestehend aus Gerüstproteinen (z.B. LAT, SLP-76) und

verschiedenen Tyrosinkinasen (z.B. Lck, ZAP70, Itk) und PLC γ zusammen. Die aktivierte PLC γ produziert IP $_3$, welches an den IP $_3$ R bindet. Dies resultiert in einer Kalzium Ausschüttung aus dem ER. Kalzium dissoziiert von der EF Hand von STIM, was eine Konformationsänderung bewirkt und zu einer Oligomerisierung und Translokation von STIM führt. In Regionen nahe der Plasmamembran interagiert STIM mit Orai und öffnet den Kanal. Der Kalziumeinstrom bewirkt die Aktivierung von Calmodulin, welches Calcineurin bindet und NFAT dephosphoryliert. NFAT transloziert in den Zellkern wo es die kalziumabhängige Gentranskription anschaltet. CaM beeinflusst auch die PMCA sowie den Kalium Kanal K $_{Ca3.1}$, der das Membranpotential aufrechterhält. (Verändert nach Hogan et al. 2010)

Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Orai1 führt zur Bindung von Kalzium an die EF Hand von Calmodulin. Dadurch kommt es zu einer Komplexbildung zwischen Calmodulin und der Serin Phosphatase Calcineurin, welche NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erhöht die DNA Bindungsaffinität. Außerdem wird das Kernlokalisierungssignal freigelegt und NFAT wird vom Zytoplasma in den Nucleus transportiert (Hogan et al. 2003). Dort wird NFAT Teil multimerischer Transkriptionsfaktorkomplexe beispielsweise mit AP-1 und reguliert dadurch lebenswichtige Prozesse wie Zytokinproduktion, Proliferation und Apoptose. Die Genexpression ist sowohl abhängig von Amplitude, Dauer und Kinetik der Kalziumkonzentrationsänderung im Zytoplasma, als auch von den mit NFAT assoziierten Transkriptionsfaktoren (Dolmetsch et al. 1997; Kim et al. 2011; Macián et al. 2002; Serfling et al. 2012). Die Überexpression von STIM oder Orai allein resultiert in HEK 239 und S2 Zellen aus Drosophila, bzw. HEK293, Jurkat und RBL Zellen (*Rat Basophilic Leukemia cells*) in einer Verringerung von iCRAC (Roos et al. 2005; Zhang et al. 2006; Vig et al. 2006). In Peinelt et al. (2006) konnte jedoch gezeigt werden, dass die Überexpression beider Komponenten iCRAC potenziert. Dies führte zu dem Schluss, dass beide Proteine nötig sind um SOCE zu aktivieren. Auch das Mengenverhältnis zwischen Orai und Stim spielt dabei eine Rolle. Eine maximale Aktivierung von iCRAC wird mit einer Ratio von 2:1 erreicht, dabei aktivieren 8 Stim Moleküle 4 Orai Untereinheiten (Hoover & Lewis 2011; Li et al. 2011).

Ist der speichergesteuerte Kalziumeinstrom über Orai defekt bzw. verändert, verursacht dies schwere Störungen in der Lymphozytenfunktion und damit des gesamten Immunsystems. Beipielsweise resultiert der Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan an Position 91 innerhalb des Orai Gens in einem Verlust von iCRAC, wodurch NFAT nicht mehr aktiviert wird. Patienten mit dieser Mutationen leiden an schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID, *Severe combined Immunodeficiency*) (Feske et al. 2001; Feske et al. 2006). SCID ist die wahrscheinlich bekannteste Kanalopathie im Zusammenhang mit CRAC, es wurden aber mittlerweile noch viele weitere *loss-of-function* und auch *gain-of-function* Mutationen von STIM1 und Orai1 identifiziert, die zu schweren Defekten von SOCE sowohl in NK-Zellen, B- und T-Zellen als auch in Zellen außerhalb des Immunsystems, wie Fibroblasten und Thrombozyten führen. Patienten mit *loss-of-function* Mutationen in STIM1 oder Orai1 weisen alle ein SCID-ähnliches Syndrom auf, charakterisiert durch lebensbedrohliche

Immundefizienz mit chronischen Infektionen, ektodermalen Dysplasien, muskulärer Hypertonie und auch Autoimmunität. Letztere ist hauptsächlich bei Patienten mit *loss-of-function* Mutation innerhalb von STIM1 zu beobachten. Bei einer *loss-of-function* Mutation von Orai1 wurde nur bei einem von sieben Patienten Autoimmunität und Lymphoproliferation beobachtet. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Möglicherweise steht diese Charakteristik mit der verringerten Zahl an CD25⁺FoxP3⁺ Treg im Zusammenhang, die nur bei STIM1 defizienten Patient gefunden wurde (Lacruz & Feske 2015).

Eine konstitutive Aktivierung von SOCE resultiert dagegen in Myopathie mit tubulären Aggregaten (*tubular aggregate myopathy*, TAM), einer muskulären Erkrankung, bzw im *York Platelet Syndrome* oder dem Storkmorken Syndrom, die die Blutgerinnung betreffen (Lacruz & Feske 2015).

3.7 Orai

Orai ein 33-kDa großes Plasmamembranprotein, bestehend aus 4 Transmembran-Helices und zytosolischen N- und C-Terminus (Soboloff et al. 2006). Alle drei in menschlichen Zellen nachgewiesenen Homologe Orai1, Orai2 und Orai3 sind in der Lage sich zu funktionsfähigen homo-und heterologen Kanalmultimeren zusammen zu schließen (Gwack et al. 2007; Lis et al. 2007). Endogene CRAC Kanäle bestehen meist aus Orai1 Multimeren (Thompson & Shuttleworth 2013) In der Studie von Lis et al. (2007) wurden die funktionellen Eigenschaften der 3 Orai Homologe ausführlich charakterisiert. Überexperimentiert in HEK293 Zellen parallel mit STIM1 zeigt Orai1 einen 2-3-fach größeren Strom als Orai2 und Orai3. Die schnellste Aktivierung wurde in Orai2 beobachtet, gefolgt von Orai1 und Orai3. Alle sind Kalzium spezifisch, aber mit unterschiedlicher Selektivität. Auch unterscheiden sie sich in ihrer kalziumabhängigen Inaktivierung. Hierbei sind Orai2 und Orai3 sensitiver gegenüber der kalziumabhängigen Inaktivierung als Orai1 welche durch Kalziumbindung an dem Kanal entsteht (Lis et al. 2007; Lee et al. 2009; Frischauf et al. 2011). Im Gegensatz dazu zeigt nur Orai1 eine langsame kalziumabhängige Inaktivierung, welche auf die Auffüllung der Kalziumspeicher und Feedback Mechanismen zurückzuführen ist. Ebenso zeigen die Orai Homologe Unterschiede in ihren pharmakologischen Eigenschaften wie der Sensitivität gegenüber der Inhibition durch 2-Aminoethyl diphenylborinat (2-APB). Während Orai1 durch 50 µM 2-APB inhibiert wird, zeigt Orai2 nur eine 50 % Inhibition. Orai3 ist dagegen nicht nur insensitiv gegen die Inhibition durch 2-APB, sondern 50 µM 2-APB resultieren sogar in einer Potenzierung des Stroms (Lis et al. 2007). Die Homologe sind häufig parallel exprimiert, die Expressionsmenge des jeweiligen Homologes ist je nach Gewebetyp unterschiedlich. Dadurch ergeben sich gewebespezifische Expressionsmuster (Prakriya & Lewis 2015).

Orai3 besitzt eine besondere Rolle hinsichtlich der Anpassung an oxidatives Milieu. Diesem sind Immunzellen in entzündlicher Umgebung besonders ausgesetzt. In naiven CD4⁺ Zellen wird SOCE durch reaktive Sauerstoff Spezies (RSO) inhibiert. Diese Inhibition lässt sich auf die Oxidation von Cystein C¹⁹⁵ zurückführen, welches Orai1 sensitiv gegenüber oxidativem Stress macht. Nach Oxidation von Orai1 bildet das C¹⁹⁵ der Transmembrandomäne 3 mit dem S²³⁹ der Transmembrandomäne 4 eine stabile Wasserstoffbrücke aus. Dadurch verbleibt das Molekül in der geschlossenen Konformation, ohne dass die Interaktion mit STIM1 beeinflusst wird (Alansary et al. 2016). Orai3 besitzt den Redoxsensor C¹⁹⁵ nicht und ist damit resistent gegen die Inhibition durch ROS (Bogeski et al. 2010). Die Hochregulation von Orai3 in T-Zellen nach CD3/CD28 Aktivierung liefert einen Mechanismus, wie sich Effektor Zellen im entzündlichen Milieu gegen die Inhibition von ROS schützen (Bogeski et al. 2010)

3.8 Das Aktivatormolekül STIM

Das Membran-durchziehende Aktivatormolekül STIM (*Stromal Interaction Molecule*) wurde 2005 noch vor dem kanal-formenden Molekül Orai über Genom weite RNAi Screens identifiziert (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005). Die beiden Homologe STIM1 und Stim 2 sind hauptsächlich in der ER Membran zu finden, STIM1 konnte auch in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Liou et al. 2005; Soboloff et al. 2006). Die Aktivierung von Orai verläuft über ER lokalisierte Stim Moleküle (Wu et al. 2006; Mercer et al. 2006; Baba et al. 2006).

Beide Paraloge weisen eine ähnliche Struktur auf. Der N-Terminus liegt transluminal im ER und beinhaltet die kalziumbindende Region (EF-Hand) sowie die für die Oligomerisierung verantwortliche SAM Domäne (*sterile- α -motif*) (Marshall et al. 2015). Eine Transmembran-Domäne durchzieht die ER-Membran und verankert Stim darin. Der C-Terminus liegt im Zytoplasma. Die zytoplasmatische Region beinhaltet die CAD oder SOAR Domäne (*CRAC activating domain* oder *STIM1 Orai activating region*), durch die Stim mit Orai interagiert und dadurch den Kalziumeinstrom aktiviert. Einzig die CAD Domäne ist nötig, um Orai zu aktivieren (Park et al. 2009; Yuan et al. 2009; Kawasaki et al. 2009).

Die physiologische Funktion von STIM1 wird durch Patientenstudien untermauert. Eine Mutation im STIM1 Gen resultiert in schwerer kombinierter Immundefizienz, mit einem noch komplexeren Krankheitsbild als durch Orai1 Mutation hervorgerufene SCID (Picard et al. 2009; Fuchs et al. 2012).

Viele Autoren beschäftigen sich mit der Rolle des Hauptaktivators STIM1 im speichergesteuerten Kalziumeinstrom. Die Funktion von STIM2 dagegen wird weniger verstanden. STIM2 aktiviert Orai1 weniger stark als STIM1 (Bird et al. 2009). In

Überexpressionstudien wurde gefunden, dass STIM2 inhibitorisch auf SOCE wirkt. (Brandman et al. 2007; Soboloff et al. 2006). Andere Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von STIM2 in T-Zellen SOCE verringert. Außerdem kann durch die Expression von STIM2 in STIM1-defizienten Zellen SOCE zumindest teilweise aufrechterhalten werden (Oh-Hora et al. 2008). Die Studie Brandman et al. (2007) beleuchtet die Rolle von STIM2 in der Regulation des basalen Kalziums in Zytosol und ER. STIM2 weist eine geringere Sensitivität zu ER Kalzium als STIM1 auf (EC₅₀ für STIM1: 210mM; EC₅₀ für STIM2: 406mM) was dazu führt, dass STIM2 bereits bei höheren Kalziumkonzentrationen aktiv ist. Dadurch kann STIM2 in ruhenden Zellen die Kalziumhomöostase in ER und Zytosol aufrechterhalten, während STIM1 mit der höheren Affinität zu Kalzium erst nach Aktivierung der Zelle und dem Abfall der ER-Kalziumkonzentration aktiv wird.

2015 wurde von Miederer und Kollegen und kurz darauf von Rana und Kollegen eine neue STIM2 Spleißvariante charakterisiert (Miederer et al. 2015; Rana et al. 2015). Die neue Spleißvariante, genannt STIM2.1 (STIM2 β in Rana et al. 2015) ist einzigartig in ihrem nur 8 Aminosäuren langen Exon (VASSYLIQ in humanen Zellen) innerhalb der Kanal aktivierenden Domäne CAD. STIM2.1 ist verglichen mit der konventionellen Variante STIM2.2 (STIM2 α in Rana et al. 2015) in vielen Zelltypen schwächer exprimiert. Es wurden jedoch vergleichbare Expressionslevel von STIM2.1 und 2.2 in naiven CD4⁺ und CD8⁺ Zellen gefunden (Miederer et al. 2015). Das Exon innerhalb der CAD Domäne der neuen Variante STIM2.1 führt dazu, dass diese nicht in der Lage ist Orai zu aktivieren. Die spezifische Herunterregulation in naiven CD4⁺ Zellen hatte eine Vergrößerung der Kalziumantwort zur Folge, während die Überexpression in HEK 293 Zellen den dominant-negativen Effekt auf die ursprüngliche Variante STIM2.2 offenbarte. Der Mechanismus wird durch eine verringerte Interaktion mit Orai1 und einer geringeren Affinität zu Calmodulin erklärt (Miederer et al. 2015). In Rana et al. (2015) werden die Effekte der neuen Spleißvariante durch eine verstärkte Inhibition, hervorgerufen durch das Exon innerhalb der CAD Domäne, erklärt.

3.9 Weitere Ionenkanäle mit Einfluss auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom

Der am besten beschriebene CRAC Kanal ist Orai1. Aber auch andere Kanäle könnten zum Kalziumeinstrom in T-Zellen beitragen. Dies kann direkt, durch die Leitung von Kalzium in die Zelle erfolgen, wie beispielsweise über die spannungsgesteuerte Kalzium Kanäle (Ca_v) und über die ATP aktivierten P2X Rezeptoren P2X4 und P2X7, die aber nicht selektiv für Kalzium sind. Außerdem kann der Kalziumeinstrom in die Zelle indirekt über die Regelung des Membranpotentials und die damit einhergehende Beeinflussung der Kalzium-Triebkraft gesteuert werden. Beispiele hierfür sind die Kalium Kanäle K_v1.3 und K_{Ca}3.1 sowie der

Natrium leitende Kanal TRPM4 (*Transient Receptor Potential Cation Channel M4*) (Feske et al. 2012).

Ein in diesem Zusammenhang viel diskutierter Kanal ist der spannungsgesteuerte Kalzium Kanal Typ1 (Ca_v1). Diese Kanäle sind hoch-selektiv für Kalzium und vermitteln den Kalziumeinstrom in erregbaren Zellen nach Depolarisation (Tsien et al. 1987). Die Rolle der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle in der Kalziumantwort in T-Zellen ist kontrovers. Alle L-Typ Ca_v Kanäle $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v1.4$ sowie deren regulatorische β -Untereinheiten sind in Lymphozyten exprimiert (Stokes et al. 2004; Badou et al. 2006). Fehlt die $\text{Ca}_v\beta3$ und $\text{Ca}_v\beta4$ Untereinheit in CD4^+ Zellen, ist der über den T-Zell Rezeptor aktivierte Kalziumeinstrom reduziert. Auch durch die Antagonisierung mit Nifedipine, Verapamil und Diltiazem war diese Reduktion zu beobachten (Kotturi et al. 2003; Stokes et al. 2004). Daneben war die NFAT Aktivierung und IL-2 Produktion sowohl in $\text{Ca}_v\beta3$ und $\text{Ca}_v\beta4$ *knock-out* Mäusen, als auch durch die Behandlung mit Nifedipine reduziert (Kotturi et al. 2003; Badou et al. 2006). Außerdem scheint $\text{Ca}_v1.4$ einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase naiver CD4^+ Zellen während der Reifung im Thymus zu haben. In einer Studie von Omilusik et al. (2011) wurde durch die Deletion von $\text{Ca}_v1.4$ gefunden, dass 50 % weniger einfach positive CD4^+ Thymozyten gebildet werden. Effektorzellen waren hingegen kaum beeinträchtigt. Ferner wurde bereits eine Interaktion von STIM1 mit $\text{Ca}_v1.2$ nachgewiesen. Dabei inhibiert STIM1 die Depolarisations-gesteuerte Ca_v Kanal Aktivität (Park et al. 2010; Wang et al. 2010). Möglicherweise spielen Ca_v Kanäle auch eine selektive Rolle in CD4^+ T-Zell Subtypen. Mittels der Antagonisierung des Proteinkinase C abhängigen $\text{Ca}_v1.2$ durch Nicardipine konnte eine stark reduzierten Kalziumantwort nach TCR-Aktivierung in Th2 Zellen gezeigt werden (Robert et al. 2014).

Trotz einiger Hinweise auf eine Rolle von L-Typ Ca_v Kanälen im speichergesteuerten Kalziumeinstrom, gibt es auch viele Fragen bezüglich der physiologischen Rolle. Fraglich ist, ob die Ca_v Kanäle den Kalziumeinstrom direkt leiten oder nur indirekt beeinflussen (Feske et al. 2012). Zudem ist die Aktivierung der Ca_v Kanäle in T-Zellen immer noch ungeklärt, da durch Depolarisation kein Kalziumeinstrom hervorgerufen werden kann (Stokes et al. 2004; Badou et al. 2006; Park et al. 2010).

Aber auch das Membranpotential beeinflussende Kanäle könnten eine Rolle im Kalziumeinstrom von Lymphozyten spielen. Beispielsweise verhindern Kalium Kanäle durch Kaliumeinstrom die Depolarisation der Zelle und halten damit den elektrischen Gradienten für Kalzium aufrecht. In Lymphozyten ist diese hauptsächlich durch den spannungsgesteuerten Kalium Kanal $\text{K}_v1.3$ und den $\text{K}_{Ca}3.1$, der direkt durch Kalzium aktiviert wird, geregelt (Feske et al. 2012). Eine Maus Studie zeigte bereits, dass die Kanäle in den verschiedenen CD4^+ Subtypen differentiell exprimiert werden. Während $\text{K}_{Ca}3.1$ in Th1

und Th2 nach Aktivierung hochreguliert werden, sind Th17 Zellen abhängig von $K_{V1.3}$. Eine Deletion von $K_{Ca3.1}$ führt zu einem geringeren Kalziumeinstrom in Th2 und Th1. Auch die Zytokinproduktion von IFN- γ , IL-2 und IL-13 war reduziert. In Th17 und Treg war die Differenzierung und Funktion dagegen nicht beeinträchtigt. Außerdem verhinderten $K_{Ca3.1}$ Blocker den Ausbruch von *Colitis* im Mausmodell, was auf ein therapeutisches Potential hinweist, da Th2 und Th1 inhibiert werden, Th17 und Treg jedoch unbeeinflusst bleiben (Di et al. 2010).

3.10 Programmierter Zelltod (Apoptose)

Apoptose wird von vielen Organismen eingesetzt, um sowohl ungewollte autologe als auch fremde Zellen zu entfernen. Dieser kontrollierte Prozess durchläuft morphologisch betrachtet mehrere Phasen. Zuerst rundet sich die Zelle noch stärker, ähnlich wie bei der Mitose. Dann bildet sich die Membran zu kleinen Bläschen, das sogenannte *Membran blebbing*, die zu apoptotischen Vesikeln abgeschnürt werden. Auch innerhalb der Zelle werden alle Organellen sowie der Zellkern fragmentiert und die DNA hydrolysiert. Die apoptotischen Vesikel werden anschließend durch Phagozytose beseitigt (Taylor et al. 2008). Für die Funktion des Immunsystems ist die Apoptose von T-Zellen genauso entscheidend wie die Proliferation. Zum einen ist es nötig, nach einer Immunreaktion die übriggebliebenen, aktivierten Zellen zu beseitigen, zum anderen müssen autoreaktive Zellen bei der Thymusselektion durch Apoptose beseitigt werden (Qu et al. 2011).

Es gibt drei unterschiedliche Signalwege um Apoptose zu aktivieren: der intrinsische und der extrinsische Apoptoseweg und der Granzym B abhängige Signalweg. Bei allen dreien sind proteolytische Enzyme, sogenannte Caspasen (*cysteine-aspartic proteases*), involviert. Diese hoch-spezifischen Proteasen schneiden nach Tetrapeptid Motiven, nach einem Aspartat (P4-P3-P2-P1; P1=Asp) (Taylor et al. 2008). Caspasen liegen bis zu ihrer proteolytischen Aktivierung als inaktive Vorläufer vor, sogenannte Pro-Caspasen, und können in Initiator Caspasen (Caspase 2, 8, 9, 10) und Effektor Caspasen (Caspase 3, 6, 7) unterteilt werden (Comi et al. 2012).

Beim extrinsischen Signalweg werden durch Bindung von FasLigand (FasL) oder Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) extrazelluläre CD95/FAS Rezeptoren, genannt Todesrezeptoren, aktiviert (Taylor et al. 2008). Zytotoxische T-Zellen produzieren FasL, um dadurch FasR exprimierende Zielzellen zu töten. Aber auch von Lymphozyten selbst wird der Rezeptor exprimiert, um durch Zelltod eliminierbar zu sein. Ist die Expression verändert, kann dies schwerwiegende Folgen haben. Ist Fas zu schwach exprimiert, kann dies zu Autoimmunerkrankungen führen, da die T-Zell Antwort nicht adäquat abgeschaltet werden

kann. Ist Fas zu stark exprimiert, können Gewebeschäden durch zu starke Antwort der zytotoxischen Zellen entstehen (Comi et al. 2012).

Durch Aktivierung des FasR wird Initiatorcaspase 8 durch Autoproteolyse aktiviert. Caspase 8 aktiviert Caspase 3 und Caspase 7 durch proteolytische Prozessierung, was zum Tod der Zielzelle führt

Beim intrinsischen Apoptoseweg werden durch Zellstress oder durch Defekte in der Zelle Proteine der BH-3-only Familie aktiviert. Diese Apoptosensoren zeigen bis auf das BH-3 Motiv wenig Sequenzhomologien und werden durch unterschiedlichste Signalwege aktiviert. Übersteigt die Produktion der BH3-only Proteine einen bestimmten Threshold, initiieren sie die Bildung von BAK-BAX Oligomere in der Mitochondrien Membran, wodurch Cytochrom C ins Zytosol entlassen wird. Dies führt zur Bildung des Apoptosoms. Dieser Komplex aus Cytochrom C und APAF1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) wandelt die Pro-Caspase 9 in die Caspase 9 um, welche wiederum Caspase 3 und 7 aktiviert.

Im Granzym B Weg wird die gleichnamige Protease von zytotoxischen T-Zellen und NK Zellen sezerniert, zusammen mit Poren-formendem Perforin. Dadurch wird die Membran der Zielzelle permeabilisiert und Granzym B gelangt dadurch in die Zelle. Dort kann Granzym B ebenfalls Substrate anhand von Aspartat Stellen erkennen und schneiden sowie Caspase 3 und Caspase 7 aktivieren (Taylor et al. 2008).

Eine defekte T-Zell Apoptose ist ein häufiger Grund für Autoimmunkrankheiten. Gerade in empfindlichen Geweben wie dem Nervensystem ist das Ausschalten der Immunantwort ein kritischer Prozess im Zusammenhang mit Autoimmunität (Comi et al. 2012). Eine genauere Untersuchung der Apoptose Mechanismen der CD4⁺ T-Zell Subtypen könnte wichtige Erkenntnisse für die Entstehung und Progression von Autoimmunerkrankungen liefern.

4 Material

4.1 Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper Western Blot

Antikörper	Klonalität	Wirt	Hersteller/ Bestellnummer	Verdünnung
α Orai1	polyklonal	Rabbit	Sigma (O8264)	1:2000
α STIM1	monoklonal	Mouse	BD Biosciences (610954)	1:250
α STIM2	polyklonal	Rabbit	Sigma (S8572)	1:1000
α -GAPDH	polyklonal	Rabbit	cell signaling (2118)	1:2000

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper Western Blot

Antikörper	Hersteller/ Bestellnummer	Verdünnung
α Rabbit	GE Healthcare Amersham (NA9340)	1:25000
α Mouse	Amersham Bioscience (NA931)	1:5000

Tabelle 3: FACS-Antikörper für intrazelluläre Zytokin Färbungen

Antigen	Fluorophore	Hersteller	Bestellnummer	Vol. in 50 μ l
α -INF γ	FITC	BD	561053	0,5 μ l
α -IL-4	Alexa 647	BioLegend	500712	2,5 μ l
α -IL-17	PE	BD	560486	5 μ l
α CD4	PerCP	BD	345770	5 μ l

Tabelle 4: FACS Antikörper für intrazelluläre Transkriptionsfaktor Färbungen

Antigen	Fluorophore	Hersteller	Bestellnummer	Vol. in 50µl
αFoxP3	PE	BD	560046	5 µl

Tabelle 5: Proteine Durchflusszytometrie

Antigen	Fluorophore	Hersteller	Hersteller/ Bestellnummer	Vol. in 100 µl
Annexin V	BV421	BD	563973	5 µl

4.2 Reagenzien

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangaben und Bestellnummern

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
β-Mercaptoethanol	Acros Organics	125472500
2-Propanol	Sigma	19516
Acrylamid-Bisacrylamid	Sigma	A7168
Albumin, Bovine Serum	Sigma	A6003
Alexa Fluor 647 Anti-human IL-4	Biolegend	500712
Annexin V	BD	563973
Anti IL-12 (p40/p70) pure, human - functional grade	Miltenyi Biotech	130-095-755
Anti IL-4 pure, human - functional grade,	Miltenyi Biotech	130-095-753
AIM-V Medium	Life Technologies	12055-083
APS	Sigma	248614-56
Dynabeads Human T Activator CD3/CD28	Life Technologies	111.32D
Calciumchlorid	Merck	102382
Cäsiumchlorid	Biomol	02450
Dinatriumhydrogenphosphat	J.T. Barker	0303
DMSO	Sigma	D8418
Dulbecco's PBS	Fisher Scientific	14190-094
Dynabeads Human T Activator CD3/CD28	Fisher Scientific	11452D
EDTA	Sigma	ED2SS
EGTA	Sigma	E4378.2506
Ethanol (absolut)	Sigma-Aldrich	32205
FACS Clean Solution	BD	340345
Fetal Bovine Serum low in Endotoxin	Sigma	F7524-50ML
FACSFlow Sheath Fluid	BD	342003
FITC mouse anti human IFN-γ clone B27	BD	561053

Fura-2-AM	Invitrogen	F1221
GolgiStop™	BD	554724
HEPES	Sigma	H7523
Human IFN-gamma1b, premium grade	Miltenyi Biotech	130-096-482
Human IL-12	Miltenyi Biotech	130-096-705
Human IL-13, resaerch grade	Miltenyi Biotech	130-093-953
Human IL-21 premium grade	Miltenyi Biotech	130-095-768
Human IL-4, premium grade	Miltenyi Biotech	130-093-919
Human IL-6, premium grade	Miltenyi Biotech	130-093-931
Human TGF- α 1, premium grade	Miltenyi Biotech	130-095-067
Ionomycin, free acid	VWR/ Calbiochem	407950
Kaliumchlorid	AnalaR	46764298
Magermilchpulver	Sucofin	
Magnesiumchlorid	Merck	105833025
Methanol	Fisher Chemical	M3950
Natriumazid	Sigma	S8032
Natriumchlorid	Sigma	S9888
Natriumhydroxid	Merck	1064821000
Oligo dT-Primer	Life Technologies	18418-012
Paraformaldehyde	Polysciences	00380-250
Penicillin/Streptomycin Sol., 10.000UN/ml	Sigma Aldrich	P4333-100ML
PE Mouse anti human FoxP3	BD	560046
PE mouse anti human IL-17A clone N49-653	BD	560486
PerCP mouse anti human CD4 clone SK3	BD	345770
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck	524400
Polyornithin	Sigma	P3655
Saponin	Sigma	S7900-25G
SDS	Acrosorganics	327315000
Thapsigargin	Invitrogen	T7458
TEA-HCl	Sigma	T2265
TEMED	Sigma	T9281
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth	3580.2
Triton X-100	Eurobio	18774
Trizma	Sigma	T1503
Trizol	Life Technologies	15596018

4.3 Lösungen

Annexin V Puffer 10x

0,1 M Hepes/NaOH (pH 7.4)

1,4 M NaCl

25 mM CaCl₂.

Für die 1x Verdünnung wird der 10x Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Primärantikörperlösungen für Westernblot

Antikörper in Tabelle 1 angegebener Verdünnung

1 % BSA

0,02 % Natriumazid

Sekundärantikörperlösung für Westernblot

Antikörper (Verdünnungen: α-Rabbit 1:25 000; α-Mouse 1:5000)

5 % Magermilch in TBST

Blottingpuffer

20 % Methanol

1 % SDS

250 mM Tris-HCl

1,92 M Glycin

pH 8.3

FACS Puffer (FB)

5 % FCS

0,5 % BSA

0,07 % NaN₃

in PBS (steril filtriert)

Imaging Lösung 0 mM Kalzium

3 mM MgCl

155 mM NaCl

4,5 mM KCl

5 mM HEPES

10 mM Glucose

Osmolarität: ~320 mosm

Imaging 0,5 mM Kalzium

0,5 mM CaCl₂

2,3 mM MgCl

155 mM NaCl

4,5 mM KCl

5 mM HEPES

10 mM Glucose

Osmolarität: ~320 mosm

Lämmli-puffer 2x

8 % SDS

120 mM Tris pH 6,8

0,1 % Bromphenolblau

20 % Glycerin

0,1 % Beta-Mercaptoethanol

Permeabilization Buffer (FBS)

FACS buffer + 0,1 % saponin

RIPA-Lyse-puffer

10 mM Tris pH 7.4

1 % Triton X-100

0,5 % NP40

150 mM NaCl

PBS, pH 7,4

Sammelgel 5 %

0,63 ml Acrylamid

3,08 ml H₂O

1,25 ml Sammelgelpuffer

37,5 µl APS

7,5 µl TEMED

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl

0,4 % SDS

pH 6,8

SDS-Elektrophoresepuffer 10x

250 mM Tris-HCl

1,92 M Glycin

1 % SDS

pH 8.3

TBS 10x

5 mM Tris-HCl

1,5 mM NaCl

pH 7.5

TBS-T

0,1 % Tween in 1x TBS

Trenngelgel 10 %

2,5 ml Acrylamid

4,91 ml H₂O

2,5 ml Trenngelpuffer

75 µl APS

15 µl TEMED

Trenngelpuffer

1,6 M Tris-HCl

0,4 % SDS

pH 8,8

4.4 qPCR Primer

Ziel mRNA	Forward Primer	Reverse Primer
Orai1	ATGAGCCTCAACGAGCACT	GTGGGTAGTCGTGGTCAG
Orai2	TGGAAGTGGTCACCTCTAAC	GGTACTGGTACTGCGTCT
Orai3	GTACCGGGAGTTCGTGCA	GGTACTCGTGGTCACTCT
STIM1	CAGAGTCTGCATGACCTTCA	GCTTCCTGCTTAGCAAGGTT
STIM2	GTCTCCATTCCACCCTATCC	GGCTAATGATCCAGGAGGTT
STIM2.1	CTCTGAAAAAGGCCGAAAAA	TGAAGCAGCAACCTCATCTTT
STIM2.1	CTCTGAAAAAGGCCGAAAAA	TTTTCTGCCTCATCTTTAGCAA
T-bet	CTGGACCCAACTGTCAATTC	CTCAGCCTCATAGCTGTGGT
TBP	CGGAGAGTTCTGGGATTGT	GGTTCGTGGCTCTCTTATC
RNA Pol	GGAGATTGAGTCCAAGTTCA	GCAGACACACCAGCATAGT

4.5 siRNA

siRNA	Sequenz	Firma
Orai1_mod	5' OMeC-OMeG-GCCUGAUCUUUAUCG d(UCU) OMeU-OMeT-OMeT 3' 3' OMeG-OMeC-CGGACUAGAAAUAGCAGA d(A) 5'	Microsynth
STIM2.1_mod	5' OMeA - OMeA (GAUGAGGUUGCUGCU) ₁₅ d(UCA) OMeU- OMeT - OMeT 3' 3' OMeT - OMeT -CUACUCCAACGACGAAGU -dA 5'	Microsynth
Non-silencing_mod	5' OMeA OMeA UUC UCC GAA CGU GUC d(ACG) OMeU-OMeT-OMeT 3' 3' OMeT OMeT AAG AGG CUU GCA CAG UGC d(A) 5'	Mircosynth

Konzentration siRNA Stock: 40 µM

4.6 Reagenziensysteme

Reagenzien	Forward Primer	Reverse Primer
BCA Protein Assay	Thermo scientific	23225
Clarity Western ECL	Biorad	1705060
Dynalbeads Untouched Human CD4	Dynal Biotech	11346D
QuantiTect SYBRgreen kit	Qiagen	204145
Transcription Factor Buffer Set	BD	562574

5 Methoden

5.1 Präparation humaner Lymphocyten (PBMCs) aus LRS Kammern

Zur Gewinnung von Lymphocyten aus dem Blut von Blutspendern wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) mittels Ficoll Dichtegradienten Zentrifugation (Ficoll-Paque™plus) aus Leukozytenreduktionskammern (LRS Kammern aus TrimaAccelSystem bzw. Amicos System) isoliert. Dafür wurden Leucosep Röhrchen mit 17ml Ficoll™ beladen und 10 Sekunden bei 1000 x g zentrifugiert. Die LRS Kammern wurden mit HBSS gespült, die mit HBSS verdünnten Zellen in die bereits mit Ficoll™ beladenen und zentrifugierten Leucosep Röhrchen aufgefangen und auf 50 ml mit Ficoll™ aufgefüllt. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 450 x g für 30 Minuten ohne Bremse und geringer Beschleunigung (Acc.:1). Nach dem Zentrifugationsschritt bilden sich verschiedene Schichten, die obere gelbliche Schicht besteht aus Plasma, der weißliche Ring aus Lymphocyten, welcher auf dem Ficoll™ aufliegt. Darunter befinden sich Granulozyten gefolgt von einer roten Schicht Erythrozyten. Der Leukozytenring wurde vorsichtig entfernt, in ein neues Falcon überführt, mit 50 ml HBSS aufgefüllt und bei 250 x g für 15 min mit Bremse zentrifugiert. Die verbliebenen Erythrozyten werden mit 2 ml Erythrozytenlyspuffer für 60-120 Sekunden je nach Zellpelletgröße lysiert. Die Reaktion wurde mit 50 ml HBSS gestoppt. Bei der darauffolgenden Zentrifugation bei 130 x g für 10 Minuten verbleiben die Thrombozyten im Überstand und werden mit diesem abgenommen. Das Lymphocytenpellet wird in 20 ml kaltem PBS mit 0,5 % BSA resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Ausbeute pro LRS-Kammer aus dem TrimaAccelSystem beträgt ungefähr 1×10^9 Lymphocyten, die aus dem Amicos System ungefähr 8×10^8 Lymphocyten. Die Isolation wurde von Carmen Hässig durchgeführt. Die Verwendung humanen Zellen aus Leukozytenreduktionskammern wurde von der Ethikkommission begutachtet und gestattet (Unbedenklichkeitserklärung vom 16.4.2015 (83/15; Prof.Dr. Rettig-Stürmer) und vom 20.8.2010 (Prof Re/Ha)).

5.2 CD4⁺ Isolation aus PBMCs

Die Isolation von CD4⁺ Zellen mittels des Dynabeads®Untouched™ Human CD4 T Cells Kits erfolgte nach Herstellerangaben, mit der Abweichung, dass die Inkubation der Bead-Zell Mischung in den Magneten von 2 Minuten auf 6-8 Minuten verlängert wurde, um zu gewährleisten, dass keine magnetischen Beads in der CD4⁺ Suspension verbleiben. Als Isolationspuffer wurde PBS mit 0,5 % BSA verwendet.

Nach der Isolation wurden die CD4⁺ Zellen gezählt und in einer Dichte von 3×10^6 Zellen in AIMV + 10 % FCS ausgesät und bis zum Beginn der in-vitro Polarisierung bei 37 °C, 5 %

CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Die Negativ-Isolation der CD4⁺ Zellen wurde von Carmen Hässig durchgeführt.

5.3 *In-vitro* Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zell Subtypen

Durch die Polarisierung werden die undifferenzierten CD4⁺ Zellen in Richtung bestimmter CD4⁺ T-Zell Subtypen differenziert. Dieser Prozess wird durch Zugabe bestimmter Zytokine und neutralisierender Antikörper gesteuert. Letztere blockieren die Differenzierung der CD4⁺ Zellen in ungewollte Subtypen.

Zu Beginn dieser Arbeit lag kein optimiertes Protokoll zur Polarisierung humaner T-Zell Subtypen vor. Aus diesem Grund erfolgte eine Etablierung der Polarisierungsbedingungen aus den vorliegenden Protokollen aus Maus und Mensch (Fitch et al., 2006; Jäger et al., 2009; Liu et al., 2013; Zhou et al., 2011). Dabei wurden verschiedene Antikörper- und Zytokinkonzentrationen sowie Bead/Zell Ratios getestet, um möglichst reine Populationen von CD4⁺ Subtypen zu erhalten.

Die isolierten CD4⁺ Zellen (untouched) wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in AIM-V Medium und 5 % Penicilin/Streptavidin, supplementiert mit Subtyp-abhängigen Zytokinen und Antikörpern, ausgesät. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit α -CD3/ α -CD28 beschichteten magnetischen Beads (Invitrogen). Diese imitieren eine immunologische Synapse, was zur Aktivierung der T-Zellen führt. Die Tabellen I bis VI zeigen die verwendeten Polarisierungsbedingungen während der Optimierung. Alle Bedingungen wurden bis zu 10 Tagen in 12-well beziehungsweise 24-well Platten bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ab VI erfolgte die Kultivierung unter Schütteln der Platte. Zentrifugiert wurden die Zellen bei 100 x g für 10 Minuten, beispielsweise für die Entfernung von Medium vor der Polarisierung. Von Tag 0 – 10 wurde während der Etablierung die Menge an Signaturzytokin beziehungsweise Signaturtranskriptionsfaktor produzierenden Zellen durch Durchflusszytometrie überwacht, um den optimalen Tag zum Ernten/Messen zu validieren. An Tag 4 wurde jeweils frisches Polarisierungsmedium zur Kultur zugeben. Die Polarisierung der Zellen sowie die Zugabe von frischem Polarisierungsmedium an Tag 4 wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (HERAsafe, Thermo fisher scientific) durchgeführt. Das Splitten der Zellen erfolgte an Tag 4 nach Polarisierungsstart. Dabei wurde nur frisches Medium zugegeben, um die von den CD4⁺ Subtypen produzierten Zytokine im Medium zu erhalten.

Tabelle 7 Polarisierungsbedingung I (Donor1)

Subtyp	Zytokine	Neutralisierende Antikörper	Bead/Zell Ratio
Th0	IL-2 (10 ng/ml)	α -IFN- γ (10 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th1	IL-2 (10 ng/ml) IFN- γ (5 ng/ml) IL-12 (20 ng/ml)	α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th2	IL-2 (10 ng/ml) IL-4 (4 ng/ml)	α -IFN- γ (10 μ g/ml) α -IL-12 (10 μ g/ml)	1:2
Th17	TGF- β 1 (5 ng/ml) IL-6 (30 ng/ml) IL-23 (25 ng/ml)	α -IFN- γ (10 μ g/ml)	1:2
Treg	IL-2 (10 ng/ml) TGF- β 1 (5 ng/ml)		1:2

Tabelle 8 Polarisierungsbedingung II (Donor 4)

Subtyp	Zytokine	Neutralisierende Antikörper	Bead/Zell Ratio
Th0	IL-2 (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th1	IL-2 (10 ng/ml) IFN- γ (5 ng/ml) IL-12 (20 ng/ml)	α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th2	IL-2 (10 ng/ml) IL-4 (30 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-12 (10 μ g/ml)	1:2
Th17	TGF- β 1 (5 ng/ml) IL-6 (30 ng/ml) IL-23 (25 ng/ml) IL-1 β (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml)	1:2
Treg	IL-2 (10 ng/ml) TGF- β 1 (5 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml)	1:2

Tabelle 9 Polarisierungsbedingung III (Donor 7-10)

Subtyp	Zytokine	Neutralisierende Antikörper	Bead/Zell Ratio
Th0	IL-2 (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th1	IL-2 (10 ng/ml) IFN- γ (5 ng/ml) IL-12 (20 ng/ml)	α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th2	IL-2 (10 ng/ml) IL-4 (100 ng/ml) IL-13 (20 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-12 (10 μ g/ml)	1:2
Th17	TGF- β 1 (5 ng/ml) IL-6 (30 ng/ml) IL-23 (100 ng/ml) IL-1 β (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Treg	IL-2 (10 ng/ml) TGF- β 1 (5 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml)	1:2

Tabelle 10 Polarisierungsbedingung IV (Donor 12-21)

Subtyp	Zytokine	Neutralisierende Antikörper	Bead/Zell Ratio
Th0	IL-2 (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th1	IL-2 (10 ng/ml) IFN- γ (5 ng/ml) IL-12 (20 ng/ml)	α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th2	IL-2 (10 ng/ml) IL-4 (30 ng/ml) IL-13 (20 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-12 (10 μ g/ml) α -IL-10 (10 μ g/ml)	1:2 entfernt an Tag 4
Th17	TGF- β 1 (5 ng/ml) IL-6 (30 ng/ml) IL-23 (100 ng/ml) IL-1 β (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Treg	IL-2 (10 ng/ml) TGF- β 1 (5 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml)	1:2

Tabelle 11 Polarisierungsbedingung V (Donor 22-38)

Subtyp	Zytokine	Neutralisierende Antikörper	Bead/Zell Ratio
Th0	IL-2 (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2/ 1:20/ 1:50
Th1	IL-2 (10 ng/ml) IFN- γ (5 ng/ml) IL-12 (20 ng/ml)	α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:2
Th2	IL-2 (10 ng/ml) IL-4 (30 ng/ml) IL-13 (20 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-12 (10 μ g/ml) α -IL-10 (10 μ g/ml)	1:20 entfernt an Tag 4
Th17	TGF- β 1 (5 ng/ml) IL-6 (30 ng/ml) IL-23 (100 ng/ml) IL-1 β (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:50
Treg	IL-2 (10 ng/ml) TGF- β 1 (5 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml)	1:2

Tabelle 12 Polarisierungsbedingung VI (Donor 39-88)

Subtyp	Zytokine	Neutralisierende Antikörper	Bead/Zell Ratio
Th0	IL-2 (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:10/ 1:20/ 1:50
Th1	IL-2 (10 ng/ml) IFN- γ (5 ng/ml) IL-12 (20 ng/ml)	α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:10
Th2	IL-2 (10 ng/ml) IL-4 (30 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-12 (10 μ g/ml) α -IL-10 (10 μ g/ml)	1:20 entfernt an Tag 4
Th17	TGF- β 1 (5 ng/ml) IL-6 (30 ng/ml) IL-23 (100 ng/ml) IL-1 β (10 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml) α -IL-4 (10 μ g/ml)	1:50
Treg	IL-2 (10 ng/ml) TGF- β 1 (5 ng/ml)	α -IFN- γ (20 μ g/ml)	1:10

Bei Polarisierungsbedingung VI handelt es sich um das endgültig optimierte Protokoll für die Polarisierung humaner CD4+ T-Zell Subtypen.

5.4 Transfektion der CD4⁺ T-Zell Subtypen mittels Elektroporation

Bei einer Transfektion wird Plasmid-DNA bzw. siRNA (*Small interfering RNA*) in Zellen eingebracht. Dies bewirkt im Falle der Plasmid-DNA eine Expression der im Plasmid codierten Gene für mehrere Tage. Das Einbringen von siRNA resultiert in einer Herunterregulation eines Zielgens durch Interferenz der siRNA mit der Messenger RNA (mRNA) des Zielgens, was zu deren Degradation führt. Diese nicht permanente Transfektion bezeichnet man als transiente Transfektion. Eine Transfektionsmethode ist die Elektroporation. Dabei wird die Zelle durch einen elektrischen Impuls gezwungen die Fremd-DNA bzw. RNA aufzunehmen.

Die Transfektionen der CD4⁺ T-Zell Subtypen erfolgte mittels des Amaxa Nucleofector™ Transfektionskits P3 Primary cell 4D von Lonza und des Programms *T cell human stimulated* des 4D Nucleofector™ Geräts. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, mit entsprechenden Anpassungen für *in-vitro* polarisierte CD4⁺ T-Zell Subtypen. Die αCD3/αCD28 Aktivatorbeads wurden entfernt und nachträglich wieder zu den Zellen gegeben. Nach der Entnahme der Beads wurden die Zellen für 10 Minuten bei 90 x g für 10 Minuten zentrifugiert, das Medium wurde aufbewahrt. Um die von den CD4⁺ T-Zell Subtypen produzierten Zytokine im Medium zu erhalten wurden sie Zellen nach der Transfektion in das alte Medium zurückgegeben. Bei der Transfektion wurde die in Tabelle 13 angegebene Menge an Konstrukt transfiziert. Die Transfektion des pCasper Plasmids erfolgte 24h vor Messung, die Transfektion der siRNA 72h vor Messung.

Tabelle 13: Transfektion CD4⁺ T-Zell Subtypen

	Konstrukt	Menge DNA/siRNA
pCasper	Plasmid DNA	5µg
STIM2.1	siRNA, modifiziert	4µl von 40µM → 1,6 µM
Orai1	siRNA, modifiziert	4µl von 40µM → 1,6 µM
Non silencing Kontrolle	siRNA, modifiziert	4µl von 40µM → 1,6 µM

5.5 Durchflusszytometrie

5.5.1 Intrazelluläre Zytokin Färbung

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die Zellen 4 Stunden mit PMA (5 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat) und Ionomycin (500 ng/ml) restimuliert und mit Golgi-Stop (4µl in 6 ml Zellkulturmedium nach Herstellerangaben) behandelt. Golgi-Stop verhindert durch Inhibition des Golgi Apparates die Sekretion der Zytokine, um eine Markierung durch Antikörper zu

ermöglichen. Nach der Restimulation wurde die Zellzahl mittels Moxi Z Zellzähler bestimmt und $0,5 \times 10^6$ Zellen in ein Eppendorf Gefäß übertragen. Die Zellen wurden zentrifugiert und einmal 500 µl mit FACS Puffer (FB) gewaschen. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei $200 \times g$ für 7 Minuten. Für intrazelluläre Färbungen muss die Zellmembran permeabilisiert werden, um intrazellulär liegende Epitope mit Antikörpern zu markieren. Um die Integrität der Zelle zu gewährleisten, werden die Zellen vorher fixiert. Die Fixierung der Zellen mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) erfolgte 15 Minuten bei Raumtemperatur. 4 % PFA wurde frisch aus 10 % PFA Stocklösung hergestellt. Die Fixierungsreaktion wurde mit 500 µl FB gestoppt und die Zellen einmal mit FB gewaschen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte eine Inkubation mit 50 µl FACS Puffer mit 0,1 % Saponin für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Permeabilisierung wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen Zytokin Epitope in die 50 µl FBS Färbelösung hinzugefügt sowie der Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD4. Die verwendeten Antikörper sowie eingesetzte Konzentrationen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben zwei Mal mit 500 µl FBS gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 200 µl FB aufgenommen. Bis zu Beginn der Messungen wurden die Proben bei 4°C im Dunkeln gelagert.

5.5.2 Transkriptionsfaktor Färbung

Diese Färbung erfordert harschere Permeabilisationsreagenzien um die Färbung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern zu ermöglichen. Hierfür wurde das Transcription Factor Buffer set (BD) nach Herstellerangaben verwendet. Pro Färbeansatz wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Verwendete Antikörper sowie eingesetzte Konzentrationen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Bis zur Beginn der Messung wurden die Proben bei 4°C im Dunkeln gelagert.

5.5.3 Annexin V Färbung

Annexin V ist ein Kalzium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, welches mit hoher Affinität Phosphatidylserin erkennt. Phosphatidylserin von apoptotischen Zellen aus inneren Membranschichten an die Zelloberfläche transportiert. Das Fluorochrom gekoppelte Annexin wird dann im Durchflusszytometer detektiert. Für die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin ist eine stabile Kalziumkonzentration essentiell. Aus diesem Grund wurde die Färbung mittels eines Annexin V Puffers durchgeführt, der nach Herstellerangaben angesetzt wurde.

Für die Färbung wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl 1x Annexin V Puffer resuspendiert und 5µl Annexin V gekoppelt mit BV421 hinzu pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde 400 µl 1x Annexin V Puffer zugegeben und die Zellen innerhalb 1h durchflusszytometrisch gemessen.

5.5.4 Durchflusszytometrische Messungen

Durchflusszytometrie beschreibt eine laserbasierte Methode, bei der simultan mehrere Parameter einer Zelle gemessen und ausgewertet werden können. Die Zellen werden anhand hydrodynamischer Fokussierung durch Laserstrahlen geführt und anhand der Emission von Streu- oder Fluoreszenzlicht unterschieden. Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC) korreliert dabei mit der Größe der Zelle und beschreibt das abgelenkte Licht im geraden Winkel. Das Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) bezeichnet die Streuung des Lichts im Winkel von ungefähr 90° und wird durch die Granularität der Zelle beeinflusst. Heterogene Zellpopulationen können deshalb anhand ihres SSC und FCS unterschieden werden, da sich bei Präparation unter vergleichbaren Bedingungen ein spezifisches FSC/SSC Profil ergibt. Zusätzlich können extra- sowie intrazelluläre Epitope mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und detektiert werden. Die Anzahl der detektierbaren Epitope ist anhängig von der Anzahl der Laser und des Filtersets. Letztere sind farbselektiv und leiten das Licht auf photosensitive Detektoren (Photomultiplier).

In dieser Arbeit wurden die durchflusszytometrischen Messungen am FACSCalibur ((Laser: 488 nm, Filter: 530/30, 575/26, 695/40; 640 nm, Filter: 660/20) und am FACS Verse (Laser: 488 nm, Filter: 530/30, 575/26, 670/14, 695/40, 780/60; 640 nm, Filter: 660/20, 780/60; 405 nm, Filter: 450/40, 525/50) von Becton Dickinson durchgeführt. Die Spannungseinstellungen wurden anhand ungefärbter Zellen und Einzelfärbungen durchgeführt. Einstrahlungen von einem Kanal in den anderen (Spill-over) wurden über einen Prozess namens Kompensation korrigiert.

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte über die FlowJo Software. Die Darstellung der Daten erfolgte als eindimensionale Histogramme oder als zweidimensionale Dot-blots. Ein Punkt in der Dot-plot Darstellung repräsentiert jeweils eine Zelle. Durch das Setzen sogenannter *Gates* kann die Analyse auf bestimmte Zellpopulationen begrenzt werden. Die Auswertung der Zellpopulationen erfolgte über prozentuale Anteile oder über die mediane Fluoreszenzintensität (Median fluorescence intensity MFI).

Tabelle 14 zeigt die verwendeten Fluorochrome und deren Extinktion- und Emissionsmaxima sowie Laser und Filter.

Tabelle 14 Fluorochrome und deren Extinktion- und Emissionsmaxima

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitations- Maximum [nm]	Emission Maximum [nm]	Laser [nm]	Filter
FITC	494	520	488	530/30
Alexa 488	495	519	488	530/30
PE	496	578	488	575/26
PerCP	482	678	488	695/40
Alexa 647	650	668	640	660/20
Pe-Cy7	496	785	488	780/60
BV421	407	421	405	450/40

5.6 Bestimmung der mRNA Expressionsmenge

5.6.1 RNA Isolation

Um die Expressionslevels von mRNA bestimmen zu können, wird die RNA aus der Zelle isoliert, gefällt und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die Isolation der mRNA erfolgte mit TRIzol nach Herstellerangaben. Die Integrität der RNA wurde durch ein 0.8 % Agarose Gel ermittelt.

5.6.2 Umschreibung in cDNA

Für die Umschreibung von RNA in cDNA wurden 0,8 µg RNA eingesetzt. Das Volumen wurde mit Aqua dest. (DEPC) auf 10 µl aufgefüllt. Damit die Gesamt-mRNA der Zelle umgeschrieben wird, werden sogenannte Oligo-dT-Primer eingesetzt, die eine komplementäre Sequenz vom Poly-A-Teil mRNA kodieren.

Die Reverse Transkription besteht aus 3 Schritten. Im ersten Schritt wird 0.8 µg RNA und der entsprechenden Menge Aqua dest. (DEPC) mit 1 µl der Oligo-dT-primers (0.5 µg/µl) and 1 µl dNTPs für 5 Minuten bei 65 °C im PCR-Cycler inkubiert. Danach werden 4 µl 5x first strand buffer, 2 µl DTT und 1 µl RNase out zugefügt. Danach wird das Reaktionsgefäß vorsichtig gevortext und kurz abzentrifugiert und anschließend für 2 Minuten bei 42°C im PCR-Cycler inkubiert. Diese ersten Schritte dienen zum Annealing der verschiedenen Komponenten. Im letzten Schritt, in dem die eigentliche Umschreibung durchgeführt wird, wird die SuperscriptII Reverse Transcriptase (1µ) zugegeben. Es folgen 2 PCR Zyklen: 50 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C. Am Ende wird die Probe auf 4°C heruntergekühlt, um die Reaktion zu stoppen.

5.6.3 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die cDNA wurde als Template verwendet, um die Menge an mRNA eines Zielgens zu quantifizieren. Dies wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Bei der quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion werden bei jedem neuen PCR Zyklus interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe in die PCR Produkte eingebaut. Die Kinetik der PCR wird dadurch sichtbar gemacht. So lange die Produktion an PCR Produktion exponentiell steigt, kann eine Quantifizierung vorgenommen werden. Am Endpunkt einer PCR ist dies nicht mehr möglich, da die Ergebnisse durch Erschöpfung des Enzyms oder Mangel an DNTPs verfälscht wird. In der exponentiellen Verlaufsphase der PCR ist die Menge an Fluoreszenz proportional zur Menge an Template des jeweiligen Zielgens. Je mehr mRNA des Zielgens zu Beginn der qRT-PCR vorlag, desto früher übersteigt die Fluoreszenz der PCR Produkte die Detektionsgrenze. Mit Hilfe einer Normierung auf die Bildung der PCR Produkte pro Zeit eines Haushaltsgens, kann die relative Menge an mRNA bestimmt werden. Da die Fluoreszenzfarbstoffe unspezifisch in doppelsträngige DNA interkalieren, sind spezifische Primerpaare für die gewünschten Zielgene unerlässlich. Die Reinheit des PCR Produktes wird mittels der Schmelzkurve überprüft. Die Schmelzreaktion wird am Ende der PCR Zyklen durchgeführt. Dabei werden die PCR Produkte stufenweise auf 95°C erhitzt. Der Verlauf der Schmelzkurve ist anhängig von der Basenzusammensetzung und damit hoch-spezifisch für jedes PCR Produkt. Befinden sich durch unspezifische Primer mehr als ein PCR Produkt im Ansatz, wird dies durch zwei unterschiedliche Schmelzkurven sichtbar.

Für die qRT-PCR wurde das QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen) verwendet. Die Experimente wurden am Bio-Rad CFX96 Real Time System durchgeführt. Das Protokoll richtete sich nach den Herstellerangaben, es wurden 0,5 µl cDNA und jeweils 375 nM Primer eingesetzt. Als Haushaltsgene wurden TBP (TATA box binding protein) und RNA Polymerase mitgeführt.

Das verwendete PCR Programms bestand aus folgenden Zyklen:

- Denaturierung zu Beginn der q RT-PCR bei 95 °C für 15 Minuten
 - Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden
 - Annealing der Primer bei 58°C für 30 Sekunden
 - Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden
 - Letzte Elongation 95 °C für 1 Minuten
- } Wiederholung für 45 Zyklen

- Schrittweise Denaturierung zum Erstellen der Schmelzkurve:
Rampe von 65 – 95 °C mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/ 5 Sekunden
- Danach Abkühlen auf 25 °C

Die Isolation von RNA, sowie die Umschreibung in cDNA und die Durchführung der qRT-PCR wurden von Gertrud Schwär durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Sarah Kircher.

5.7 Bestimmung der Proteinmenge in CD4⁺ Zellen

Um die Proteine bestimmter Zelltypen wie CD4⁺ Zellen nachzuweisen, werden die Proteine aus Zellpellets isoliert und die Proteinmenge im Zelllysate mittels BCA-Assay bestimmt. Anschließend wird eine definierte Menge Protein auf ein Gel geladen und durch SDS Page der Größe nach aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden mittels eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen. Danach können die Proteine mittels Antikörper detektiert und quantifiziert werden.

5.7.1 BCA Assay

Für die Bestimmung der Proteinmengen wurde ein BCA-Assay (Bicinchoninsäure-Assay) durchgeführt. Bei dieser Zwei-Schritt Reaktion werden Cu²⁺ von Proteinen zu Cu⁺ Ionen reduziert. Im zweiten Reaktionsschritt reagieren die Cu⁺ Ionen mit dem BCA. Diese Reaktion ist durch einen densitometrisch nachweisbaren lila Farbumschlag gekennzeichnet, der proportional zu Proteinmenge ist.

Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und das Pellet anschließend bei -20°C gelagert. Die eingefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und mit Ripa-Lysepuffer versetzt.

Zum Aufschließen der Zellen wurden diese bei 4°C 30 Minuten geschüttelt und danach im Ultraschall Wasserbad für 3 Mal 30 Sekunden behandelt. Anschließend wurden die Lysate 20 Minuten bei 21300 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das aus Zelltrümmern bestehende Pellet wurde verworfen. Von den Lysaten wurden Verdünnungsreihen angesetzt (1:100 und 1:200), die Proteinstandards für die Standardkurve (Konzentrationen: 0,0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 mg/ml) wurden gevortext. Das BCA Reagenz wurde nach Herstellerangaben verdünnt und je 200 µl in eine 96-well-Platte

vorgelegt. Dazu wurde je 25 µl Standardlösung bzw. Proteinlysateverdünnung pipettiert. Die Proteinverdünnungen wurden jeweils doppelt bestimmt.

Die densitometrische Bestimmung erfolgte bei 465 nm. Es wurde eine Standardkurve berechnet und anhand dieser die Konzentration der Proben nach Herausrechnen des Verdünnungsfaktors bestimmt. Aus den Proteinlysaten wurde das Volumen entnommen, das 75 µg Protein entspricht und mit 2x Lämmli-Puffer versetzt und 15 Minuten bei 65°C denaturiert.

5.7.2 SDS-Page

Mittels einer elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Damit bei dieser Auftrennung nur die Masse und nicht auch Faltung bzw. Ladung der Proteine eine Rolle spielt, wurden die Proteine durch das überschüssige SDS (*sodium dodecyl sulfate*) im Puffer der SDS Page alle gleich stark negativ geladen sowie durch Zerstörung der Sekundär und Tertiärstrukturen linearisiert. Durch das β-Mercaptoethanol im Lämmli-Puffer wurden die Disulfidbrücken aufgebrochen. Nach diesem Denaturierungsschritt wurden die Proben auf ein diskontinuierliches Gel aufgetragen. Die Verwendung von unterschiedlichen Puffern beim Gießen des 2-phasigen Gels gewährleistet, dass die Proben zuerst im neutralen, großporigen Sammelgel konzentriert werden, um dann im basischen, kleinporigen Trenngel aufgetrennt zu werden. Es wurden 10 % Trenngele und 5 % Sammelgele verwendet. Als Marker für das Molekulargewicht diente der Dual Color Marker. Als Laufpuffer diente der SDS-Elektrophorese

Für die Fokussierung der Probe im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Sobald die Probe in das Trenngel eintritt, wird die Spannung auf 150 V erhöht.

5.7.3 Western Blot

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden zwecks Immobilisierung und Detektion durch Antikörper auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um die Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran zu übertragen. Das Blotting der Proteine auf die Membran erfolgte bei 0,35 mA bei 4°C für 90 Minuten. Als Blottingpuffer wurde 1x SDS-Puffer mit 20 % Methanol eingesetzt. Die Membran wurde mit 5 % Magermilch in TBS-T 1 h bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Es folgte die Inkubation mit primären Antikörpern über Nacht unter Schütteln bei 4°C. Die eingesetzten Konzentrationen der verwendeten primären Antikörper sind Tabelle 1 ersichtlich. Nach der Inkubation erfolgten 3 10-minütige Waschschrte mit TBS-T, um unspezifische

Antikörperbindungen zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur mit den korrespondierenden Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt (Tabelle 2). Danach wurden unspezifische Bindungen durch zwei 10-minütige Waschschrte mit TBS-T und einem 10-minütigen Waschschrte mit TBS entfernt. Letzterer Waschschrte wurde ohne Tween durchgeführt, da Tween die Entwicklungslösung (ECL) beschädigt.

Die Detektion des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Clarity Western ECL-Kit von Bio-Rad nach Herstellerangaben. Bei der ECL Reaktion (Enhanced Chemi Luminescence) oxidiert die an den sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase durch das Wasserstoffperoxid in der ECL Lösung zu Luminol, welches Licht emittiert.

Die Chemilumineszenz wurde mittels des Gel-Dokumentationssystems von Bio-Rad detektiert. Nach der Entwicklung wurden alle Westernblots anschließend mit Antikörpern gegen das Haushaltsgen GAPDH geprobt um die Proteinmenge zu normieren. Die Bandendichte wurde mit der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert und anschließend auf die Bandendichte der jeweiligen GAPDH Bande normiert.

5.8 Messung der intrazellulären Kalzium Konzentration mittels Fura-2 AM

Die zytosolische Kalzium Konzentration kann mittels des Kalzium-bindenden Farbstoffes Fura 2 AM durch Fluoreszenzmessungen auf Einzelzellebene bestimmt werden. Der Transport in die Zellen verläuft durch die Acteomethyl-Ester Gruppe (AM). Diese wird von zytosolischen Esterasen hydrolysiert, was Rücktransport aus der Zelle verhindert. Die Messung verläuft über die Anregung des Polyaminocarboxylate Fluorophors bei 340 nm und 380 nm, welches divalente Kationen bindet. Das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Kalziumbindung führt zu höherer Fluoreszenz bei der Anregung mit 340 nm und niedrigerer Fluoreszenz bei der Anregung bei 380 nm. Durch die Bildung des Quotienten beider Fluoreszenzen (340nm/380nm) werden die variablen Parameter wie Zelldicke und Messapparatureigenschaften herausgerechnet, wodurch die Werte die Änderung der Kalziumkonzentration beschreiben. Mittels einer Kalibration der Maximal- und Minimalwerte lassen sich die Werte in Kalziumkonzentrationen umrechnen.

Die Kalibrationsgleichung wurde von Grynkiewicz et al. (1985) aufgestellt und beruht auf der Umrechnung der Fluoreszenz in Kalziumkonzentration. Die Umrechnung lautet wie folgt:

$$\text{Kalzium (nM)} = K_d (\text{Fura}) \times ((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) \times (F_{R380} / F_{B380})$$

Bei der K_d handelt es sich um die Dissoziationskonstante für Fura-2 AM bei 37°C (224 nM), R ist der Quotient der bei 340nm und 380 nm gemessenen Werte. R_{\min} ist der Ratio Wert in Abwesenheit von Kalzium und R_{\max} der Ratio Wert bei 20mM Kalzium und damit im

gesättigten Zustand. F_{R380} repräsentiert die Fluoreszenz von Fura-2 AM im Kalzium gesättigten Zustand (20mM) gemessen bei 380nm und F_{B380} die Fluoreszenz in 0 mM Kalzium und damit freiem Fura-2 AM bei 380 nm.

Die Messung der Maximalwerte erfolgte mit Hilfe von Ionomycin und Thapsigargin in 0 mM Kalziumlösung bzw. 20 mM Kalziumlösung. Die Kombination von Ionomycin und Thapsigargin bewirkt eine komplette Kalziumentleerung der Zelle. Anschließende Applikation von 20 mM Kalzium resultiert in einem maximalen Anstieg der Kalziumkonzentration in der Zelle, unabhängig von Kanälen, wodurch eine Sättigung erzielt wird und dadurch der Zelltyp- und Setup-abhängige Maximalwert ermittelt werden kann.

Um die nicht-adhärenenten T-Zellen auf dem Objektträger zu befestigen, wurde letztere mit 65µl p-Ornithin (0,1 mg/ml) präinkubiert. Die Beladung der Zellen mit Fura-2 AM erfolgte für 22 Minuten in 1 µl/ml Fura-2 AM. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit 8-15µl (je nach Pelletgröße) 0,5 mM Kalziumlösung resuspendiert und auf den Objektträger appliziert.

5.8.1 Ca^{2+} -readdition Protokoll

Das Messprotokoll war ein sogenanntes Ca^{2+} -readdition Protokoll. Die Schritte mit zugehörigen Erklärungen wird in Tabelle dargestellt. Die Messung erfolgt 380 Zyklen lang, ein Zyklus entspricht 5 Sekunden. Nach jedem Zyklus erfolgt eine Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm.

Tabelle 15: Ca^{2+} Readdition Protokoll

Zyklus	0-20	20-80	80-200	200-320	320-380
Kalzium-konz. (mM)	0,5 Ca^{2+}	0 Ca^{2+}	0 Ca^{2+} +Tg	0,5 Ca^{2+} +Tg	0,5 Ca^{2+} +Tg
	Messung des basalen Kalziums	Entfernung extrazelluläres Kalzium um präaktivierte Zellen auszuschließen	Entleerung ER-Speicher; Aktivierung STIM	Zugabe von extrazellulärem Kalzium; Kalziumeinstrom durch speicher-gesteuerte Kalziumkanäle	Entfernung Kalzium zur Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Die Analyse der Messungen wurde durch das TillVision Programm und Igor ausgeführt. In TillVision wurde der Hintergrund im 340 sowie dem 380 Kanal subtrahiert und anschließend die Fluoreszenzwerte der Zellen durch Setzen von *Regions of Interest* (ROI) bestimmt. In Igor wurden dann mittels der Kalibrationsgleichung die Fluoreszenzwerte auf Kalziumkonzentrationen normiert und die Parameter Kalziumpeak, Einflussrate und Kalziumplateau berechnet und durch Mittelwerte quantifiziert.

5.8.2 Aktivierung des Kalziumeinstroms über α CD3/ α CD28-Aktivator-Beads

Um eine physiologischere Aktivierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms zu bewirken, wurde die TCR Aktivierung über α CD3/ α CD28 gekoppelte Beads nachgeahmt. Die Beads wurden von oben in die Messkammer appliziert, die Zellen befanden sich während der kompletten Messzeit in 0,5 mM Kalziumlösung. Am Ende der Messung wurde ein Durchlichtbild des Bildausschnitts aufgenommen und die Zellen mit Bead-Kontakt nach Synchronisation des Zeitpunktes des Bead Kontakts in die Auswertung inkludiert.

5.9 Kinetische Apoptosemessungen

Um die Kinetiken der Apoptose zu visualisieren, wurden *in-vitro* polarisierte CD4⁺ T-Zell Subtypen mit dem pCasper Konstrukt transfiziert (Transfektion siehe 5.4.) und über einen Zeitraum von 4 h am Cell Observer (Zeiss) fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen. Das transient in die Zelle eingebrachte Konstrukt exprimiert den Apoptosesensors Casper3-GR (Evrogen) bestehend aus einem rot und ein grün fluoreszierendes Protein (TagRFP und TagGFP), welche über eine Caspase3 Erkennungssequenz (DEVD) verbunden sind. In einer intakten Zelle agiert GFP als das Donorprotein welches Energie auf den Akzeptor RFP überträgt (FRET, Försters Resonanz Energie Transfer). In apoptotischen Zellen in denen Caspase3 aktiv ist, erlaubt die Distanz zwischen den beiden Proteinen keine Energieübertragung für FRET, da die Verbindungssequenz zwischen den Proteinen geschnitten wird und sich die Proteine weiter als 10 nm voneinander entfernen. Dies resultiert in einer Erhöhung der GFP Emission. Das Sinken des FRET Signals bzw. der Anstieg des GFP Signals kann deshalb benutzt werden um Apoptose zu messen.

Um die Apoptose von *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen über Zeit zu beobachten, wurden je 200×10^3 Zellen auf p-Ornithin (50 μ l 0,1 mg/ml) präinkubierte Wells einer 96-well Platte in 100 μ AIM-V ausgesät. Um die Apoptose zu induzieren, wurde 1 μ M Staurosporin zugegeben. Die Messung erfolgte in einer Inkubationskammer bei 37°C mit 5 % CO₂ über 4h.

Die Auswertung erfolgte im Modul Physiologie der Till Vision Software. Die Formel zur Kalkulation der FRET-Donor Ratio wurde die FRET Youvan Formel (Youvan et al. 1997) eingesetzt. Hierfür musste die Korrekturfaktoren (cf) mittels einzeltransfizierter Zellen (jeweils RFP und GFP) bestimmt werden. Die Korrekturfaktoren beschreiben den Prozentsatz an Einstrahlung von Donor in Akzeptorkanal und umgekehrt. Die Messung und Berechnung der Korrekturfaktoren erfolgte nach dem Handbuch der Zeiss Axiovision Software. Als Korrekturfaktor für GFP beträgt 3 %, der für RFP 30 %.

Da die Zellen trotz Poly-L-Ornithin starke Bewegungen zeigten, war es nicht möglich die Fluoreszenz durch händisch gesetzte Regions of Interest (ROI) zu kalkulieren. Aus diesem Grund wurden die nach Youvan-Formel kalkulierte FRET-Donor Ratio wurden als TIFF Datei gespeichert und in die Imaris (Bitplane) Software übertragen. Dort war es möglich durch automatische Zellerkennung die FRET-Donor Ratio über Zeit zu kalkulieren. Dabei folgte der ROI der fluoreszenten Zelle über die Zeit. Der Threshold für die Fluoreszenzerkennung wurde auf 12 μm festgelegt, damit wurden alle fluoreszenten Partikel mit einem Durchmesser größer gleich 12 μm getrackt. Weitere Thresholds wurden für den Abstand der ROI zum Bildrand ($> 30 \mu\text{m}$) gesetzt sowie für die Dauer des Bestehens der Fluoreszenz während der Messung (> 300 Sekunden). Die Werte der automatisch getrackten FRET-Donor Ratio wurden anschließend in Excel exportiert.

5.10 Statistik

Alle Balkendiagramme repräsentieren Mittelwerte, die Fehlerbalken Standardfehler des Mittelwerts. Als statistischer Test wurden zweiseitige ungepaarte TTests angewendet, außer bei Abbildung 27, 28 und 29, bei diesen wurde ein gepaarter zweiseitiger TTests verwendet. Dabei bedeutet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Als nicht signifikant (n.s.) wurden Ergebnisse mit einem p-Wert $> 0,05$ eingestuft.

6 Ergebnisse

6.1 Optimierung der *in-vitro* Polarisierung von CD4⁺ Zellen in T-Zell Subtypen

Zu Beginn des Projekts gab es in der Literatur kein vollständiges Protokoll zur Polarisierung humaner CD4⁺ Zellen. Um die Kalziumsignale der CD4⁺ T-Zell Subtypen zu charakterisieren, musste deshalb die Polarisierung humaner CD4⁺ Zellen in die unterschiedlichen Subtypen etabliert und optimiert werden. Der Erfolg der Polarisierung wurde über intrazelluläre Färbung der Signaturzytokine bzw. -Transkriptionsfaktor mittels Durchflusszytometrie, sowie durch Änderungen des SOCE Profils (Signalstärke des Kalziumsignals und der Expressionslevel der SOCE Komponenten) überprüft. Dabei wurde das komplette Set aller Signaturzytokine (IFN- γ , IL-4, IL-17) sowie der Signaturtranskriptionsfaktor (FoxP3) gefärbt, um sicherzustellen, dass eine spezifische Produktion vorliegt. Ziel war es, CD4⁺ Subtypen *in-vitro* zu polarisieren, die hauptsächlich das eigene Signaturzytokin und möglichst geringe Mengen anderer Zytokine produzieren.

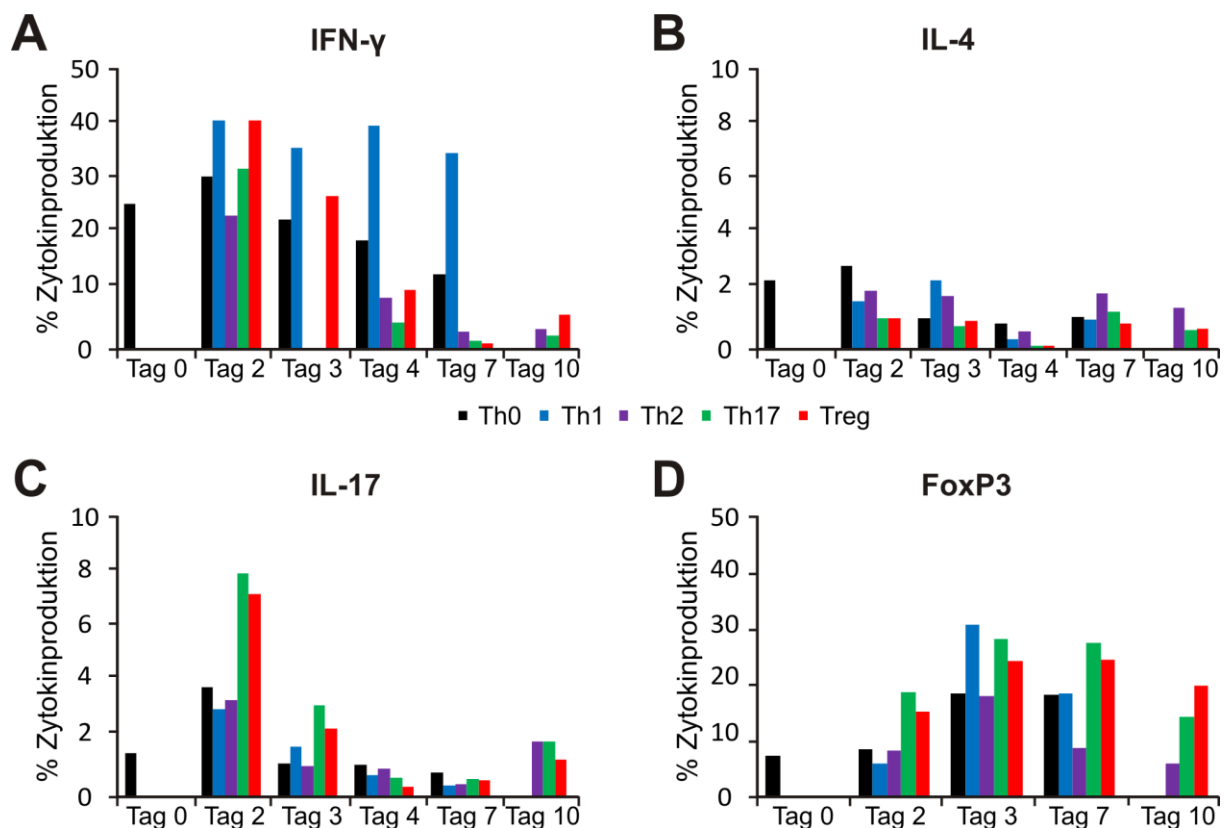


Abbildung 4: Kinetische Analyse der Zytokinproduktion der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ Zellen über 10 Tage. Die Polarisierung erfolgte unter Polarisierungsbedingung I (Tabelle 7). Die CD4⁺ Subtypen Th1, Th2, Th17 und Treg, sowie die Kontrolle Th0 wurden auf die Produktion folgender Signaturzytokine bzw. -transkriptionsfaktoren überprüft A: IFN- γ , B: IL-4, C: IL-17, D: FoxP3 (Donor 1; n = 1)

Um den Zeitpunkt der höchsten Produktion zu finden, wurde die Zytokinproduktion über mehrere Tage analysiert. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse von Donor 1.

Abbildung 4A zeigt die IFN- γ Produktion von Tag 0 bis Tag 10. Th1 wiesen an Tag 2 bis Tag 7 zwischen 35 % und 40 % IFN- γ -produzierende Zellen auf. Jedoch war bei Th2, Th17 und Treg die IFN- γ Produktion ebenfalls erhöht. Treg zeigten eine ähnliche Menge IFN- γ -produzierende Zellen wie Th1. In Th2 und Th17 war die Menge an IFN- γ -produzierenden Zellen nicht so hoch wie in Th1, aber über 20 %. Ab Tag 4 wurde die IFN- γ Produktion spezifischer für Th1, da in Th2, Th17 und Treg die Menge an IFN- γ produzierenden Zellen sank. An Tag 7 erreichten die IFN- γ produzierenden Zellen in den anderen Subtypen das Minimum. Dies spricht dafür, dass Tag 7 besser als Tag 4 für die Polarisierung von Th1 Zellen geeignet ist, obwohl die Produktion von IFN- γ in Th1 nach Tag 4 nicht mehr stieg. An Tag 10 war die Menge an Th1 Zellen nicht ausreichend um eine valide Aussage zu treffen, aber durch die Mengen an IFN- γ -produzierenden Zellen der anderen Subtypen konnte zumindest die Spezifität gezeigt werden. Abbildung 4B zeigt die kinetische Analyse der IL-4 Produktion der verschiedenen CD4⁺ Subtypen (Tag 0-10). Die Menge an IL-4 produzierenden Zellen war insgesamt mit weniger als 3 % in allen Subtypen sehr gering. Th2 zeigte zu keinem Zeitpunkt eine spezifische Produktion des Th2 Signaturzytokins IL-4. Auch das Signaturzytokin von Th17 IL-17 wurde nach der in *in-vitro* Polarisierung unter Polarisierungsbedingung I nicht spezifisch von Th17 produziert (Abbildung 4C). An Tag 2 zeigten Th17 Zellen circa 8 % IL-17 produzierende Zellen, ähnlich wie regulatorische T-Zellen mit 7 %. Nach Tag 2 sank die IL-17 Produktion insgesamt bei allen Subtypen auf unter 3 %. Auch die FoxP3 Produktion war unter Polarisierungsbedingung I nicht spezifisch für regulatorische T-Zellen (Abbildung 4D). Zwar stieg die Anzahl an FoxP3 produzierenden Zellen in Treg auf knapp 25 %, aber auch in den anderen Subtypen erhöhte sich die FoxP3 Produktion über die Zeit auf bis zu 30 %.

Um eine spezifische Signaturzytokinproduktion zu erzielen, wurde das Protokoll angepasst (siehe Tabelle 8 Polarisierungsbedingung II (Donor 4)). Die α -IFN- γ Konzentration wurde in allen Subtypen bis auf Th1 verdoppelt. In Th2 Zellen wurde zusätzlich die IL-4 Konzentration von 4 ng/ml auf 30 ng/ml erhöht. Dem Polarisierungsmedium für Th17 wurde IL-1 β (10 ng/ml) hinzugefügt, da IL-1 β die Differenzierung in Th17 positiv beeinflusst (Wilson et al. 2007; Acosta-Rodriguez et al. 2007; Ganjalikhani Hakemi et al. 2011).

Die Polarisierungseffizienz wurde anhand der Menge an Signaturzytokin produzierenden Zellen sowie FoxP3-produzierenden Zellen von Tag 0 bis 11 untersucht. Die Ergebnisse von Donor 4 sind in Abbildung 5 bis Abbildung 8 dargestellt.

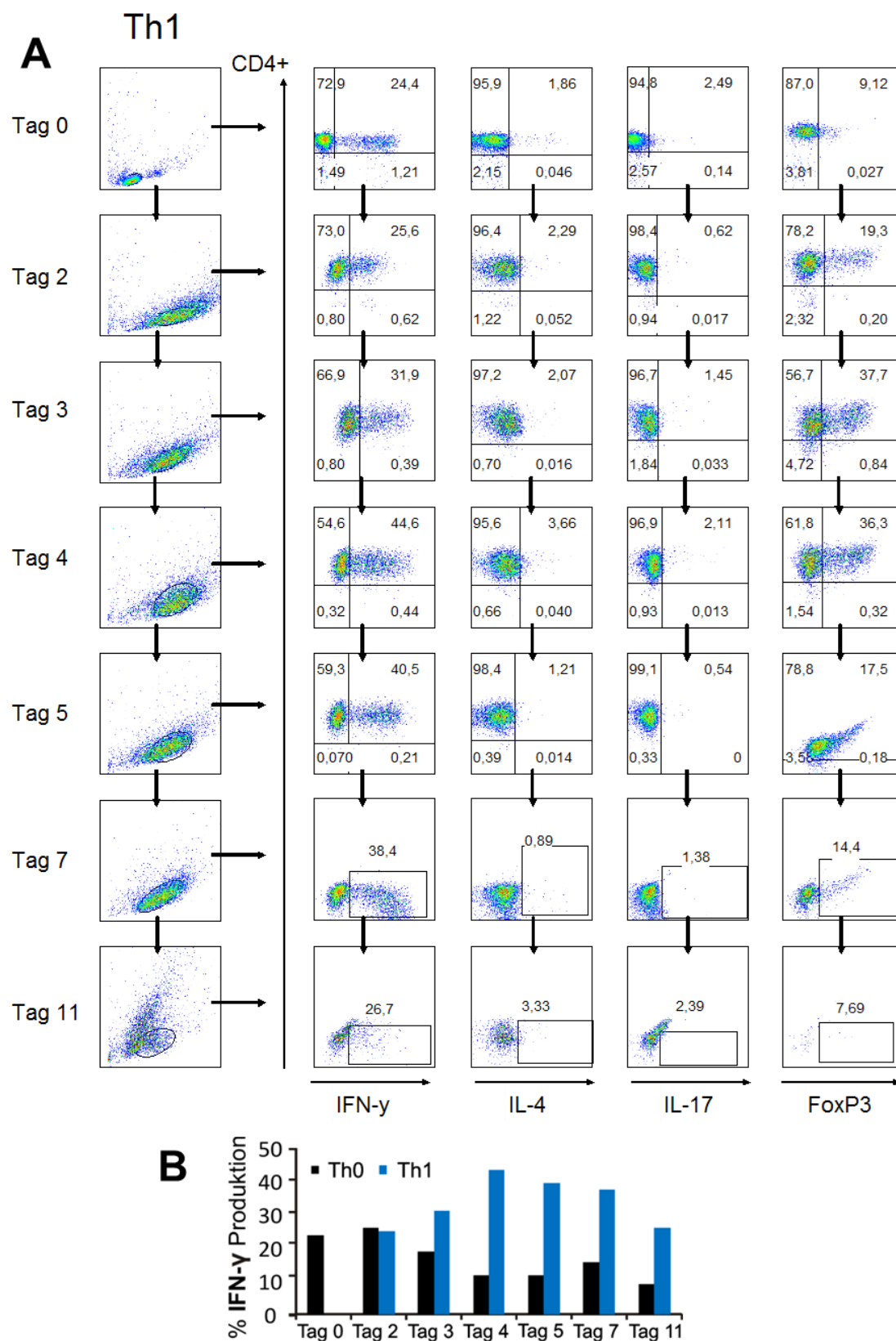


Abbildung 5: Kinetische Analyse der Zytokinproduktion der *in-vitro* polarisierten Th1 Zellen über 11 Tage. Die Polarisation erfolgte unter Polarisierungsbedingung II (Tabelle 8). A: Dotblots der CD4⁺ Expression aufgetragen gegen IFN- γ , IL-4, IL-17 und FoxP3 Produktion von Tag 0 bis Tag 11 in Th1. B: Vergleich INF- γ produzierende Zellen in Th0 (schwarz) und Th1 (blau). (Donor 4; n = 1)

Abbildung 5A zeigt das Zytokinprofil der Th1 Zellen unter Polarisierungsbedingung II über die Zeit. Der höchste Anteil an IFN- γ produzierenden Th1 Zellen war zwischen Tag 4 und 7 zu detektieren, danach sank die Menge IFN- γ produzierender Zellen wieder. Bis Tag 4 lag der Anteil an FoxP3 produzierenden Zellen noch bei knapp 40 %, reduzierte sich aber bis Tag 7 auf knapp 15 %. Die Spezifität der Zytokinproduktion in Th1 Zellen nahm somit bis Tag 7 zu. Parallel dazu fiel zudem auch mit Dauer der Polarisierung die Menge an IFN- γ produzierenden Zellen in Th0 Zellen (Abbildung 5B, schwarze Balken).

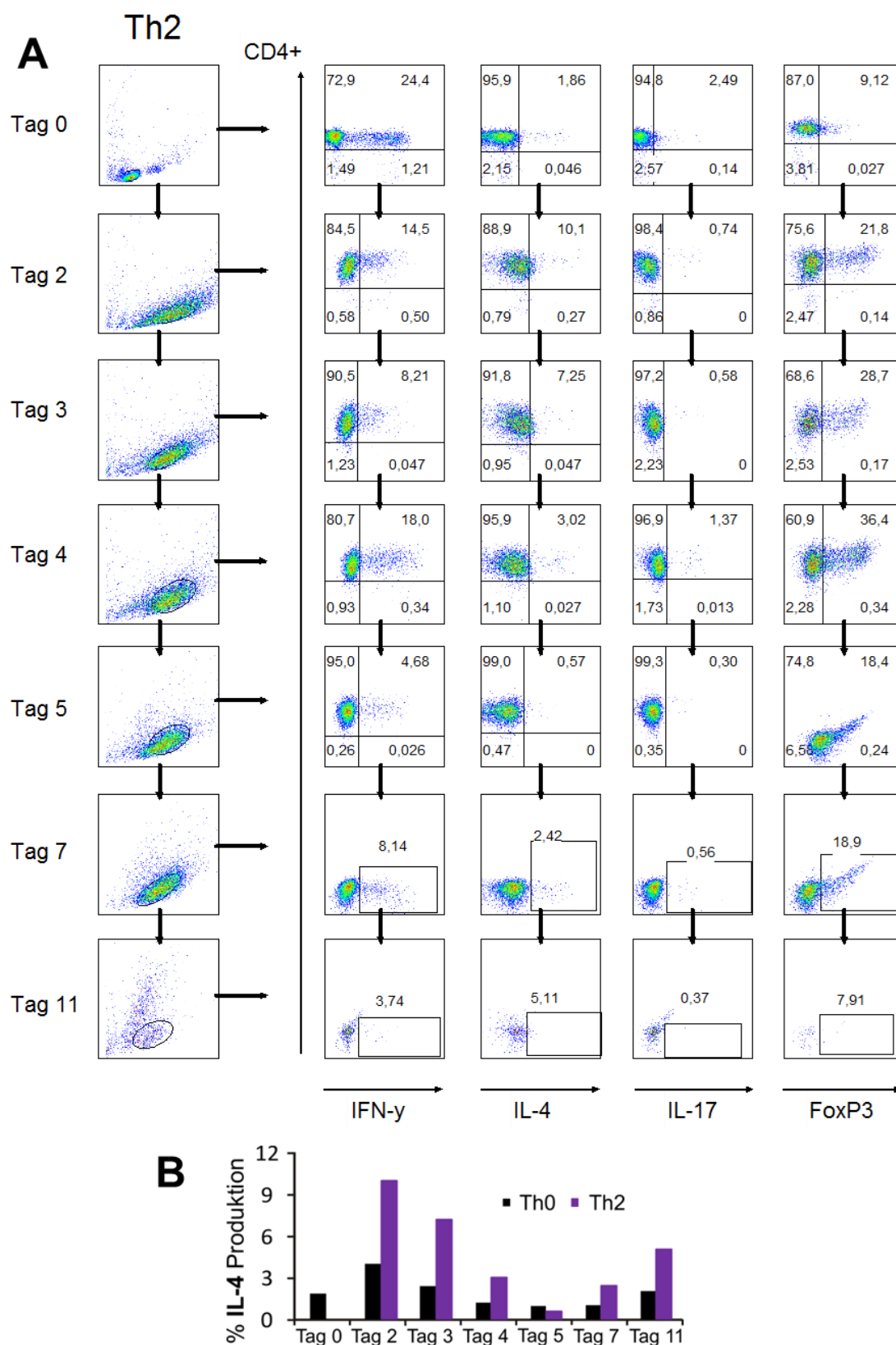


Abbildung 6: Kinetische Analyse der Zytokinproduktion der *in-vitro* polarisierten Th2 Zellen über 11 Tage. Die Polarisierung erfolgte unter Polarisierungsbedingung II (Tabelle 8). A: Dotblots der CD4⁺ Expression aufgetragen gegen IFN- γ , IL-4, IL-17 und FoxP3 Produktion von Tag 0 bis Tag 11 in Th2. B: Vergleich IL-4 produzierende Zellen in Th0 (schwarz) und Th2 (lila). (Donor 4; n = 1)

Das Zytokinprofil von Th2 (Tag 0 bis 11) ist in Abbildung 6A dargestellt. Die Signaturzytokinproduktion von IL-4 in Th2 lag auch bei Polarisierungsbedingung II zu keinem Zeitpunkt über 10 %. Durch die Erhöhung von α -IFN- γ konnte die IFN- γ Produktion in Th2 Zellen stark gesenkt werden, was zu einer spezifischeren Zytokinproduktion beiträgt. Vergleicht man die IL-4 Produktionen in Th2 mit Th0 in der Quantifizierung (Abbildung 6B), zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Die Anzahl an IL-4 produzierenden Zellen in Th0 lag an Tag 2 bei ungefähr 4 %, ab Tag 5 bei 2 % oder kleiner.

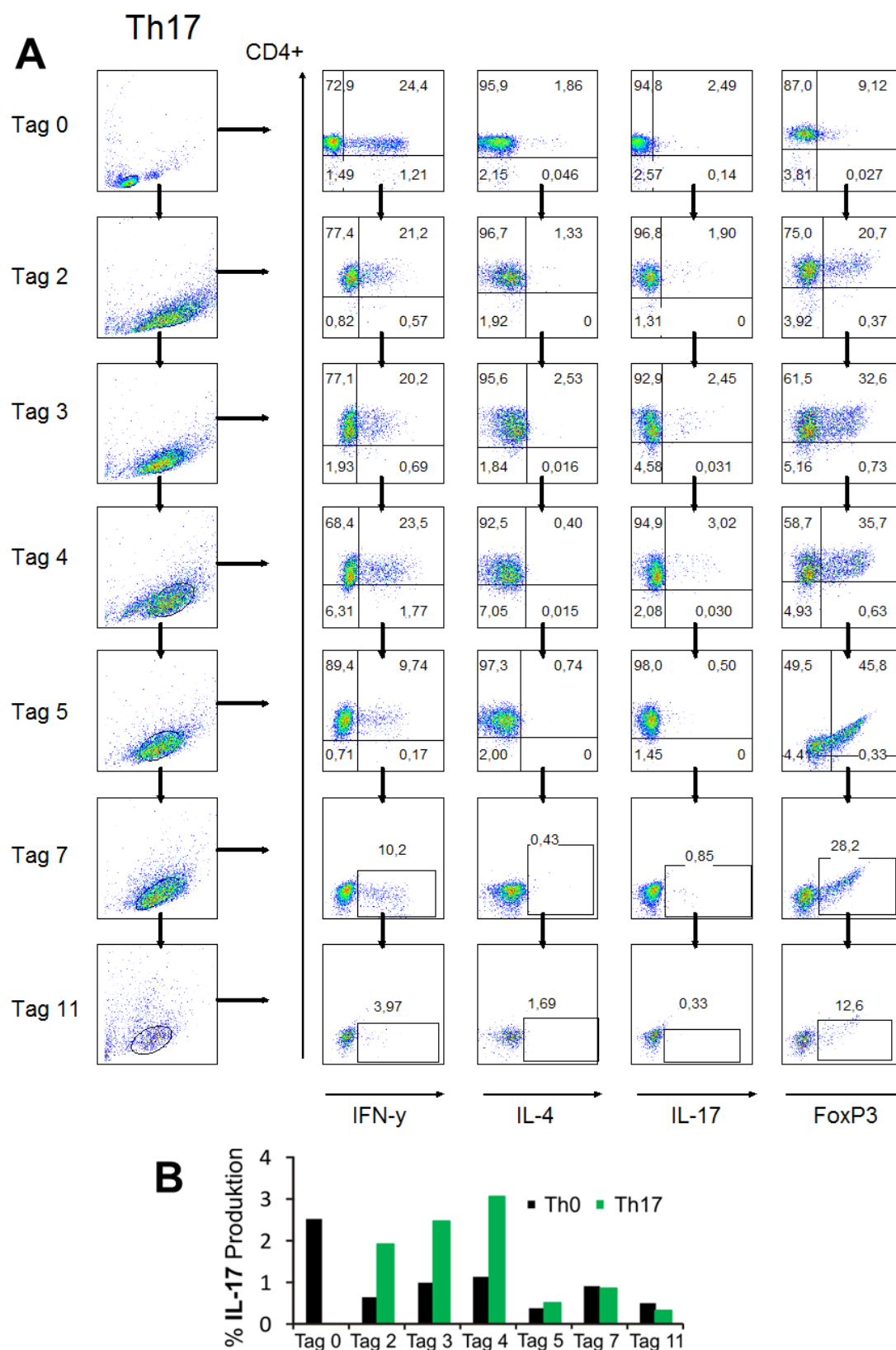


Abbildung 7: Kinetische Analyse der Zytokinproduktion der *in-vitro* polarisierten Th17 Zellen über 11 Tage. Die Polarisierung erfolgte unter Polarisierungsbedingung II (Tabelle 8). A: Dotblots der CD4⁺ Expression aufgetragen gegen IFN- γ , IL-4, IL-17 und FoxP3 Produktion von Tag 0 bis Tag 11 in Th17. B: Vergleich IL-17 produzierende Zellen in Th0 (schwarz) und Th17 (grün). (Donor 4; n = 1)

Abbildung 7A zeigt die Untersuchung der Zytokinproduktion in Th17 Zellen über einen Zeitraum von 11 Tagen. Wie auch bei Th2 konnte durch die Erhöhung der α -IFN- γ Konzentration im Polarisierungsmedium für Th17 eine Reduzierung der IFN- γ produzierenden Zellen induziert werden. Durch die Zugabe von IL-1 β und IL-23 im Polarisierungsmedium konnte zudem die IL-17 Signaturzytokinproduktion etwas verbessert werden. Sie stieg bis Tag 4 nach Start der Polarisierung an und fiel danach wieder stark ab. Verglichen mit der Populationsgröße der IL-17 produzierenden Zellen in Th0 (Abbildung 7B) mit 1 % oder weniger war der Anstieg spezifisch aber mit maximal 3 % nichtsdestotrotz sehr gering. Parallel dazu stieg auch die Menge FoxP3 produzierender Zellen an, möglicherweise durch den Einfluss von TGF- β , welches auch Treg Differenzierung induzieren kann (Chen et al. 2003; Zheng et al. 2004; Fu et al. 2004).

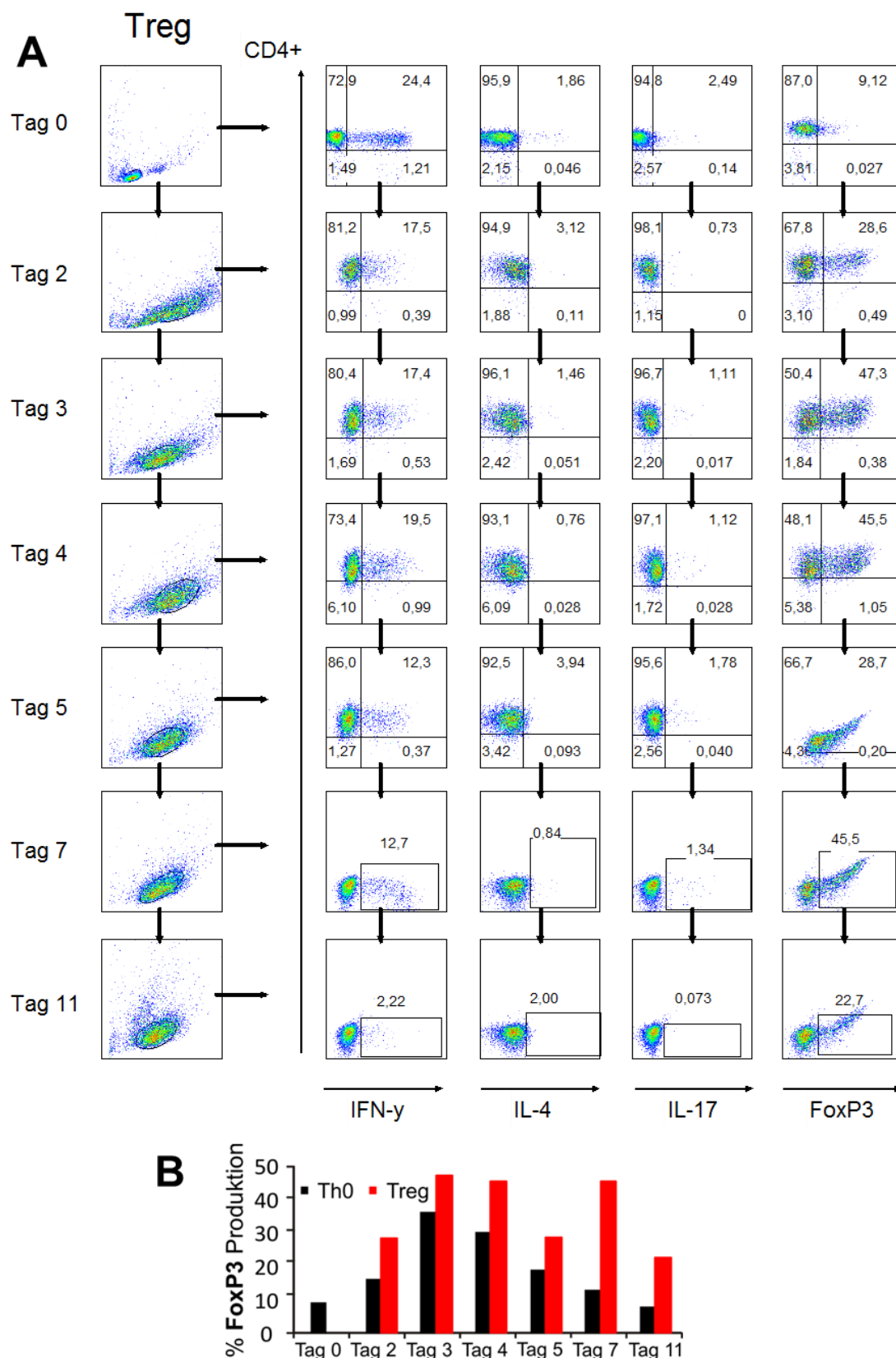


Abbildung 8: Kinetische Analyse der Zytokinproduktion der *in-vitro* polarisierten Treg Zellen über 11 Tage. Die Polarisierung erfolgte unter Polarisierungsbedingung II (Tabelle 8). A: Dotplots der CD4⁺ Expression aufgetragen gegen IFN-γ, IL-4, IL-17 und FoxP3 Produktion von Tag 0 bis Tag 11 in Treg. B: Vergleich FoxP3 produzierende Zellen in Th0 (schwarz) und Treg (rot). (Donor 4; n = 1)

In Abbildung 8A ist das kinetische Zytokinprofil der regulatorischen T-Zellen unter Polarisierungsbedingung II (Tabelle 8) dargestellt. Durch die Erhöhung der α -IFN- γ Konzentration im Polarisierungsmedium für Treg konnte die Menge an produziertem IFN- γ reduziert werden. Dadurch lag die Menge an IFN- γ produzierenden Zellen in Treg in einem ähnlichen Bereich wie die Menge an IFN- γ produzierenden Zellen in der Kontrolle Th0 (vgl. Abbildung 6). An Tag 3 bis 7 lag die Populationsgröße der FoxP3-produzierenden Zellen in Treg bei 45 % Zytokin-produzierenden Zellen. Vergleicht man damit die Produktion von FoxP3 in Th0 (Abbildung 8B) wird deutlich, dass die Spezifität der FoxP3 Produktion an Tag 7 am Höchsten war. Die Menge an FoxP3 produzierenden Zellen in Th0 lag hier bei 13 % während in Treg 46 % erreicht wurden.

Da die spezifische Signaturzytokinproduktion in Th2 und in Th17 durch Polarisierungsbedingung II noch nicht gewährleistet werden konnte (Abbildung 6 und Abbildung 7), wurden diese Subtypen noch weiter optimiert (Tabelle 9 Polarisierungsbedingung III (Donor 7-10)). Im Polarisierungsmedium von Th2 wurde IL-13 (20 ng/ml) und α -IL12 (10 μ g/ml) hinzugefügt. Für die Th17 Polarisierung wurde die IL-23 Konzentration von 25 ng/ml auf 100 ng/ml erhöht und α -IL-4 (10 μ g/ml) hinzugefügt. Die Polarisierungsbedingungen von Th1 und Treg wurden nicht verändert.

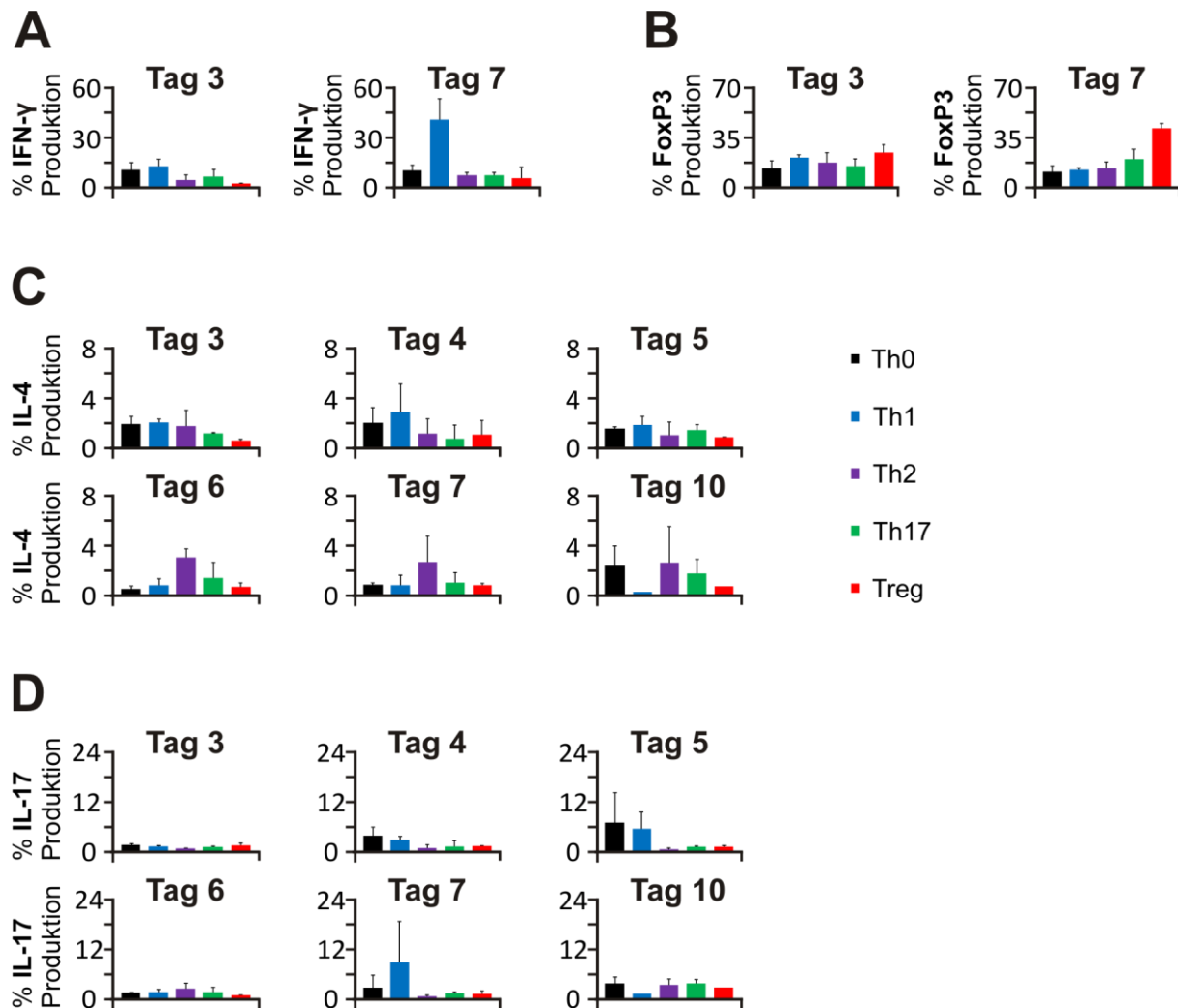


Abbildung 9: Zytokinprofil der Subtypen unter Polarisierungsbedingung III (Donor 7-10), Tabelle 9 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. A: IFN- γ an Tag 3 und Tag 7. B: FoxP3 Produktion an Tag 3 und Tag 7. C: IL-4 Produktion an Tag 3-10. D: IL-17 Produktion an Tag 3-10. (n = 2-3)

Abbildung 9 zeigt das Level an Zytokin-produzierenden Zellen in den verschiedenen Subtypen, polarisiert mittels Tabelle 9 Polarisierungsbedingung III (Donor 7-10) über die Zeit. In Abbildung 9A ist die IFN- γ Produktion der CD4⁺ Subtypen dargestellt. An Tag 3 waren die Anteile an IFN- γ produzierenden Zellen in allen Subtypen ähnlich hoch, nach 7 Tagen Polarisation wurde die Produktion spezifisch für Th1. Auch die FoxP3 Produktion zeigte einen ähnlichen Verlauf in den CD4⁺ T-Zell Subtypen, nach 7 Tagen Polarisation konnte hier eine spezifische Produktion in Treg erreicht werden (Abbildung 9B). Hierdurch konnte bestätigt werden, dass die Protokolle von Th1 und Treg keine weitere Modifikation benötigten. Die Menge an IL-4 produzierenden Zellen stieg, verglichen mit den restlichen Subtypen, tendenziell ab Tag 6 in Th2 an (Abbildung 9C). Mit 3 % war der Anteil an IL-4-produzierenden Zellen aber jedoch gering.

Die in Abbildung 9D gezeigte Quantifizierung der IL-17 produzierenden Zellen zeigt, dass durch Polarisierungsbedingung III noch keine spezifische IL-17 Produktion in Th17 Zellen etabliert werden konnte. Alle Subtypen produzierten kleine Mengen an IL-17 ohne eine spezifische Erhöhung in Th17 Zellen zu erreichen.

Da in Th2 der Anteil an IL-4 produzierenden Zellen gering war (Abbildung 9C), wurden in Polarisierungsbedingung IV (Tabelle 10, Donor 12-21) die α CD3/ α CD28 gekoppelten Aktivator Beads von Th2 Zellen entfernt, um zu testen ob durch geringere Stimulationsdauer die Polarisierung in Th2 Zellen verbessert werden kann.

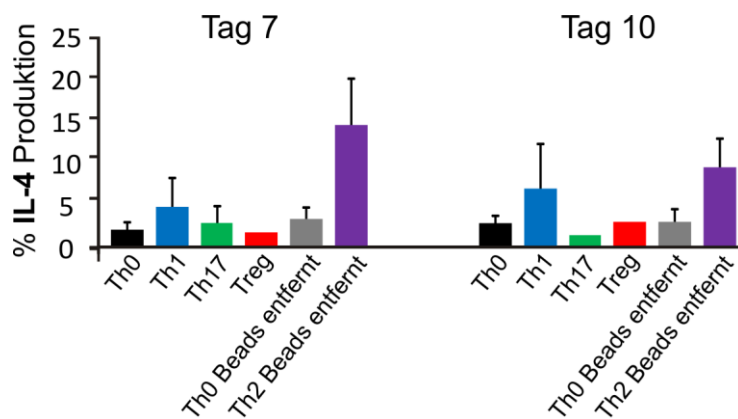


Abbildung 10: Quantifizierung IL-4 produzierende Zellen in Subtypen polarisiert unter Polarisierungsbedingung IV (Donor 12-21) an Tag 7 und Tag 10. (n = 5-6; außer Treg:n = 1)

Durch Entfernung der α CD3/ α CD28 gekoppelten Aktivator Beads konnte die IL-4 Produktion in Th2 Zellen im Mittelwert an Tag 7 auf fast 15 % gesteigert werden (Abbildung 10), jedoch nicht signifikant verglichen mit der Menge an IL-4 produzierenden Zellen in Th0 und Th0 mit gleicher Stimulation (Th0 Beads entfernt). Der Effekt der längeren Inkubation nach der Bead Entfernung wurde an Tag 10 gemessen (Abbildung 10). Es konnte durch die veränderte Stimulation eine Steigerung auf fast 10 % IL-4 produzierende Zellen induziert werden. Diese Steigerung erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau.

Um die damit einhergehenden Veränderungen auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom der verschiedenen CD4⁺ T-Zell Subtypen parallel zu der Polarisierung zu untersuchen und zu charakterisieren wurden die SOCE Profile bereits während der Optimierung untersucht. SOCE wurde mittels Fura-2 AM basiertem Ca²⁺ Imaging charakterisiert. Die Polarisierung der CD4⁺ T-Zell Subtypen erfolgte hierbei unter Polarisierungsbedingung IV. Es sollte untersucht werden, ob ein verändertes Zytokinprofil über die Zeit auch mit einer Veränderung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms korreliert. Aus diesem Grund erfolgten die Kalzium Messungen parallel zu den intrazellulären Färbungen der Zytokine und

Transkriptionsfaktoren am Durchflusszytometer. Die Messungen wurden von Tag 4 bis 13 Tage durchgeführt

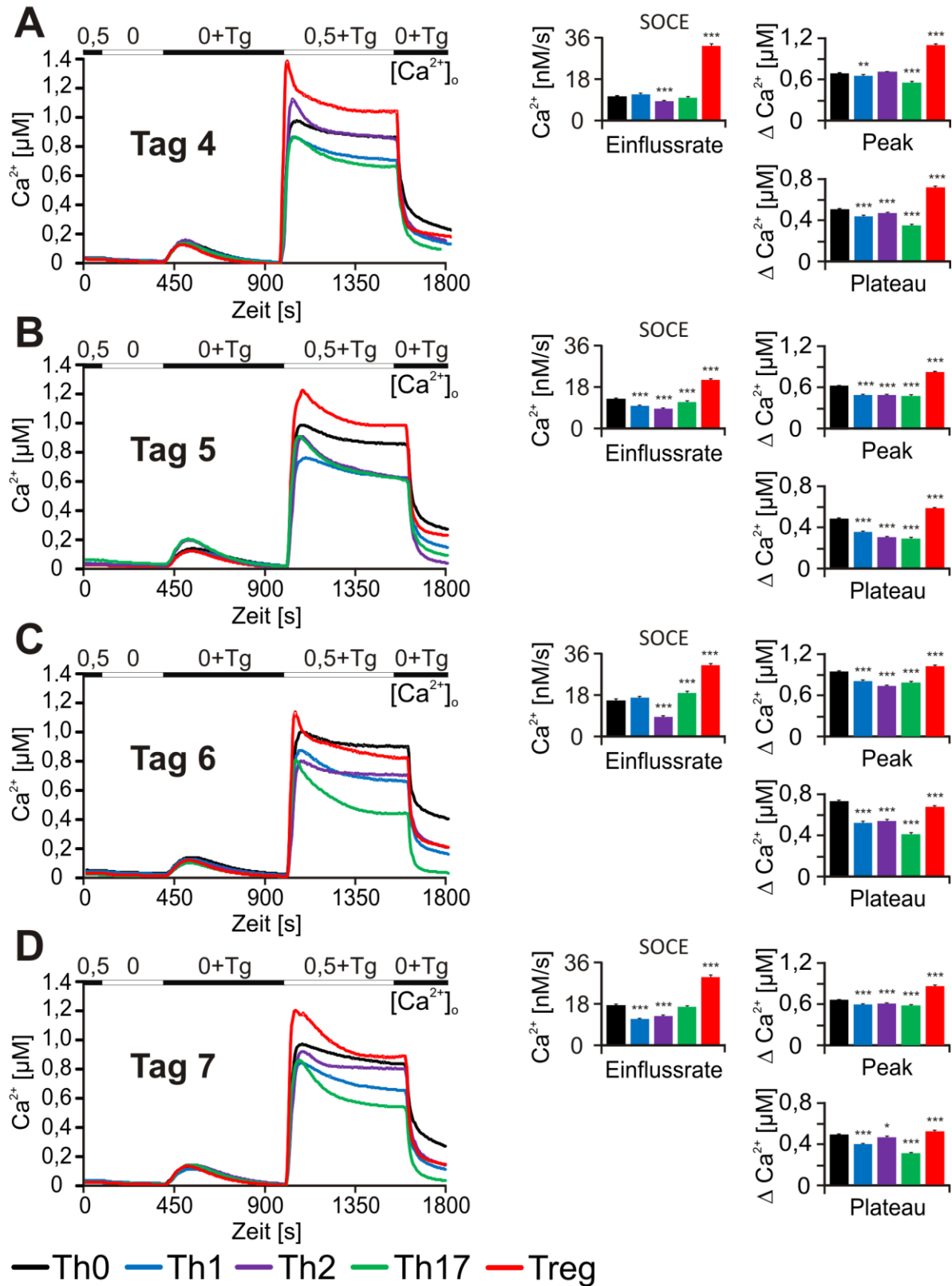


Abbildung 11: SOCE nach Polarisierung der CD4⁺ Zellen in T-Zell Subtypen durch Polarisierungsbedingung IV (Tabelle 10, Donor 12-21). Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura-2 AM basiertem Ca²⁺-Imaging an Tag 4-7 nach Polarisierungsbeginn. Aktivierung SOCE wurde über das Ca²⁺-readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin induziert. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (2-3 Messungen pro Messtag). Daraus wurde mittlere Einstromrate, mittlerer Kalziumpeak und Plateau kalkuliert (Balkendiagramme). Für die Liniendiagramme wurde der mittlere zeitliche Verlauf jedes Messtages auf den Maximalwert des Mittelwertes des Messtages der dazugehörigen Kontrolle Th0 normiert. Die normierten Mittelwerte der Einzelmessungen wurden anschließend anhand der Anzahl der Einzelmessungen gewichtet (gewichteter Mittelwert). Hierfür wurden die normierten Mittelwerte mit der Anzahl der jeweils gemessenen Einzelzellen der Bedingung multipliziert. Die Produkte jedes Messtages wurden addiert und anschließend, um den gewichteten Mittelwert zu erhalten, durch die Gesamtsumme der Einzelzellen dividiert. Die Liniendiagramme zeigen 2-4 Spender, mit jeweils 2-3 Einzelmessungen mit je 100-150 Einzelzellen pro Experiment. Tag 4: n (Th0) = 1090, n (Th1) = 450, n (Th2) = 799, n (Th17) = 528, n (Treg) = 413. Tag 5: n (Th0) = 1287, n (Th1) = 872, n (Th2) = 393, n (Th17) = 354, n (Treg) = 1035. Tag 6: n (Th0) = 366, n (Th1) = 329, n (Th2) = 341, n (Th17) = 332, n (Treg) = 1035. Tag 7: n (Th0) = 1335, n (Th1) = 1055, n (Th2) = 737, n (Th17) = 1077, n (Treg) = 647.

Bereits an Tag 4 der Polarisierung zeigten sich unterschiedliche Phänotypen des speichergesteuerten Kalziumeinstroms. Bei regulatorischen T-Zellen waren sowohl Einstromrate als auch Kalziumpeak und -Plateau (Abbildung 11A) signifikant erhöht. Bei Th1, Th2 und Th17 waren an Tag 4 noch kaum Unterschiede der Kalziumsignale zu Th0 zu erkennen. Mit fortlaufender Polarisierung wurden die Unterschiede immer ausgeprägter. An Tag 7 zeigten alle Subtypen signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle Th0 in den Parametern Kalziumeinstromrate, Peak und Plateau.

Die in Abbildung 10 gezeigte Tendenz zur höheren Polarisierungseffizienz in Th2 durch Veränderung des Aktivierungsstimulus gab den Hinweis auf eine Optimierungsmöglichkeit in Bezug auf den Stimulus. In Purvis et al. (2010) wurde gezeigt, dass ein niedrigerer Stimulus zu einer erhöhten IL-17 Expression auf mRNA Ebene führt. Angelehnt an dieses Protokoll wurde in Polarisierungsbedingung V (Tabelle 11) das Verhältnis von Zellen zu Aktivator Beads reduziert. In den vorherigen Polarisierungsbedingungen wurden die Zellen mit einem Verhältnis 1 Bead zu 2 Zellen stimuliert. In Polarisierungsbedingung V wurde die Aktivator Bead/Zell Ratio für Th2 auf 1:20 und für Th17 auf 1:50 erniedrigt.

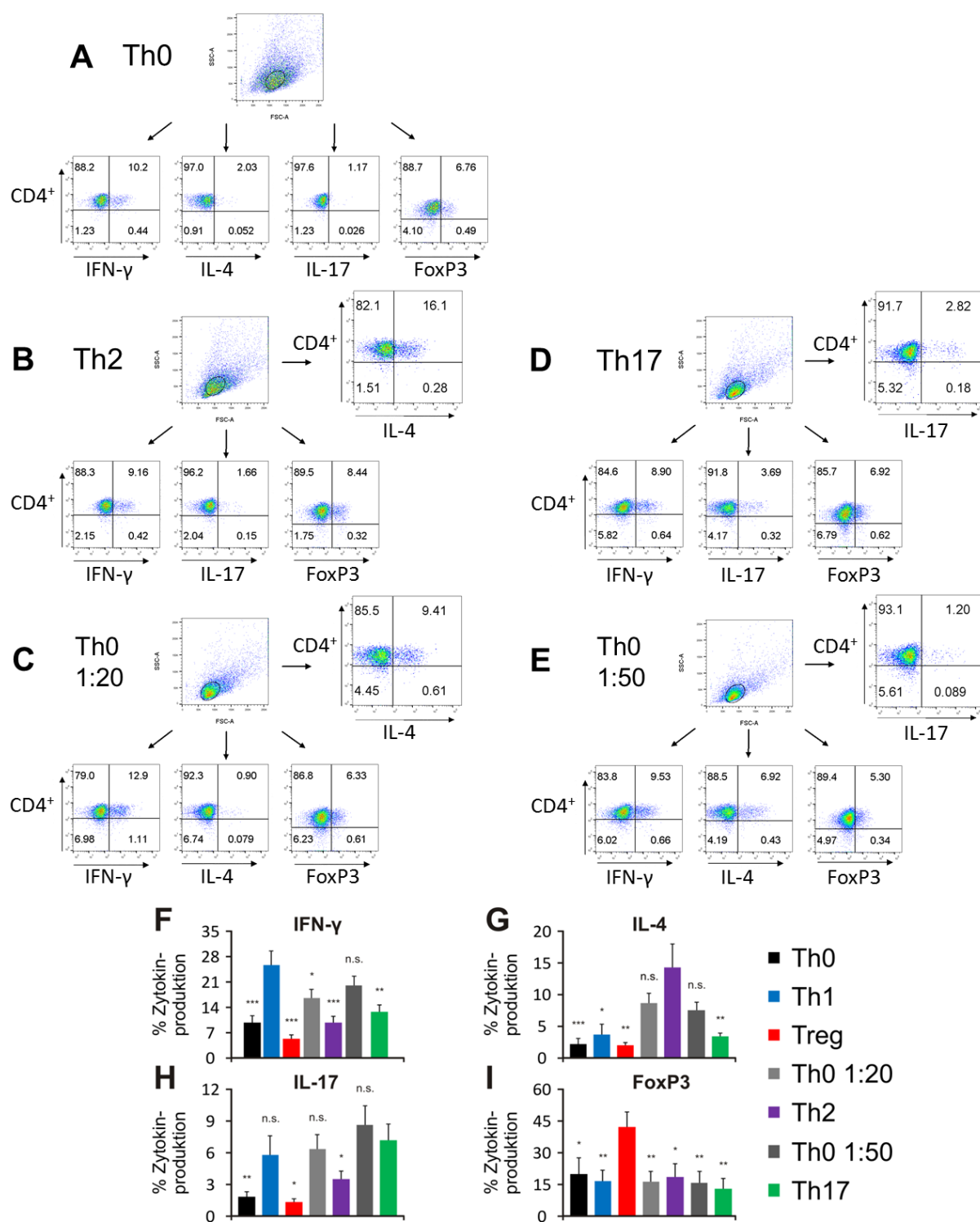


Abbildung 12: Zytokin Level in Th2 und Th17 mit zugehörigen Kontrollen (Th0, Th0 1:20 und Th0 1:50) an Tag 7 der Polarisierung (Polarisierungsbedingung V). A: Zytokinprofil Th0, B: Zytokinprofil Th2, C: Zytokinprofil Th0 1:20, D: Zytokinprofil Th17, E: Zytokinprofil Th0 1:50. (Repräsentative Abbildungen). Die Balkendiagramme zeigen den mittleren Anteil Zytokin-produzierender Zellen von Th0, Th1, Treg, Th0 1:20, Th2, Th0 1:50, Th17. Das Balkendiagramm F zeigt den mittleren Anteil IFN-γ produzierender Zellen der jeweiligen CD4⁺ T-Zell Subtypen. Das Balkendiagramm G zeigt den mittleren Anteil IL-4 produzierender Zellen der jeweiligen CD4⁺ T-Zell Subtypen. Das Balkendiagramm H zeigt den mittleren Anteil IL-17 produzierender Zellen der jeweiligen CD4⁺ T-Zell Subtypen. Das Balkendiagramm I zeigt den mittleren Anteil FoxP3 produzierender Zellen der jeweiligen CD4⁺ T-Zell Subtypen. (n = 11)..

Nach Erniedrigung der Aktivator Bead/ Zell Ratio konnte die Signaturzytokinproduktion in Th2 und Th17 gegenüber Th0 signifikant erhöht werden. In Th2 lag die Menge an IL-4 produzierenden Zellen nun bei 14 %. Die Produktion war spezifisch (Abbildung 12B), die Produktion anderer Zytokine war vergleichbar mit der Kontrolle Th0. In Th0 lag die Menge an IL-4 produzierenden Zellen bei 2 % (Abbildung 12A und G), in Th1, Th17 und Treg unter 4 % und damit signifikant niedriger (Abbildung 12G). Nur in den Bead Kontrolle Th0 1:20 (Abbildung 8C und G) und Th0 1:50 (Abbildung 12E und G) war die IL 4 Produktion mit 8,5 % und 7,5 % im Mittelwert etwas höher. Parallel dazu produzierten Th2 nach der Polarisierung unter Polarisierungsbedingung V nur geringe Mengen an IFN- γ , IL-17 und FoxP3 (Abbildung 12 B, F, H, I).

Bei Th17 Zellen konnte durch den schwächeren Stimulus ebenfalls eine Erhöhung der IL-17 Produktion erzielt werden. Die Population der IL-17 produzierenden Zellen war nun klar abgrenzbar (Abbildung 12D) und konnte auf 7 % gesteigert werden. Verglichen mit der Kontrolle Th0 war die IL-17 Produktion spezifisch und signifikant, die Bead Kontrolle Th0 1:50 lag jedoch immer noch bei über 8 % und damit höher als in Th17 Zellen (Abbildung 12 G und E). Unter Polarisierungsbedingung V produzierten Th17 außerdem nur geringe Mengen IFN- γ , IL-4 und FoxP3 (Abbildung 12D, F, G, I). Diese Ergebnisse indizierten bereits, dass eine Reduktion der Stimulus Intensität die Richtung Th2 bzw. Th17 treiben. Der Effekt konnte durch die Verwendung des neutralisierenden Antikörpers α -IL-4 im Medium der Beadkontrolle Th0 1:20 nicht aufgehoben werden

Die Signaturzytokinproduktion von IFN- γ in Th1 Zellen war unter Polarisierungsbedingung V spezifisch und signifikant (Abbildung 12F). Th1 produzierten hauptsächlich IFN- γ und nur in geringem Maße IL-4, IL-17 und FoxP3 (Abbildung 12G, H, I). Auch die regulatorischen T-Zellen zeigten eine signifikante und spezifische Produktion ihres Signaturtranskriptionsfaktors FoxP3 (Abbildung 12I) und parallel dazu eine geringere Produktion an IFN- γ , IL-4 und IL-17 (Abbildung 12F, G, H).

Die Polarisierungsbedingung wurden weiter optimiert um die Zytokinproduktion in den Bead Kontrollen Th0 1:20 und Th0 1:50 noch weiter zu reduzieren. Außerdem sollte die Stimulationsstärke in Th1 und Treg verringert werden, um weniger Zelltod nach Transfektion zu induzieren. Th0, Th1 und Treg wurden mit geringerer Ratio von Aktivator Beads zu Zellen aktiviert (1:10), die Mediumzusammensetzung aus Bedingung V wurde aber beibehalten. Die gesamte Polarisierung wurde auf dem Schüttler im Brutschrank durchgeführt. Die Ergebnisse der endgültigen Polarisierungsbedingungen (Polarisierungsbedingung VI, Tabelle 12, Donor 39-88) sind in Abbildung 13 bis Abbildung 16 dargestellt.

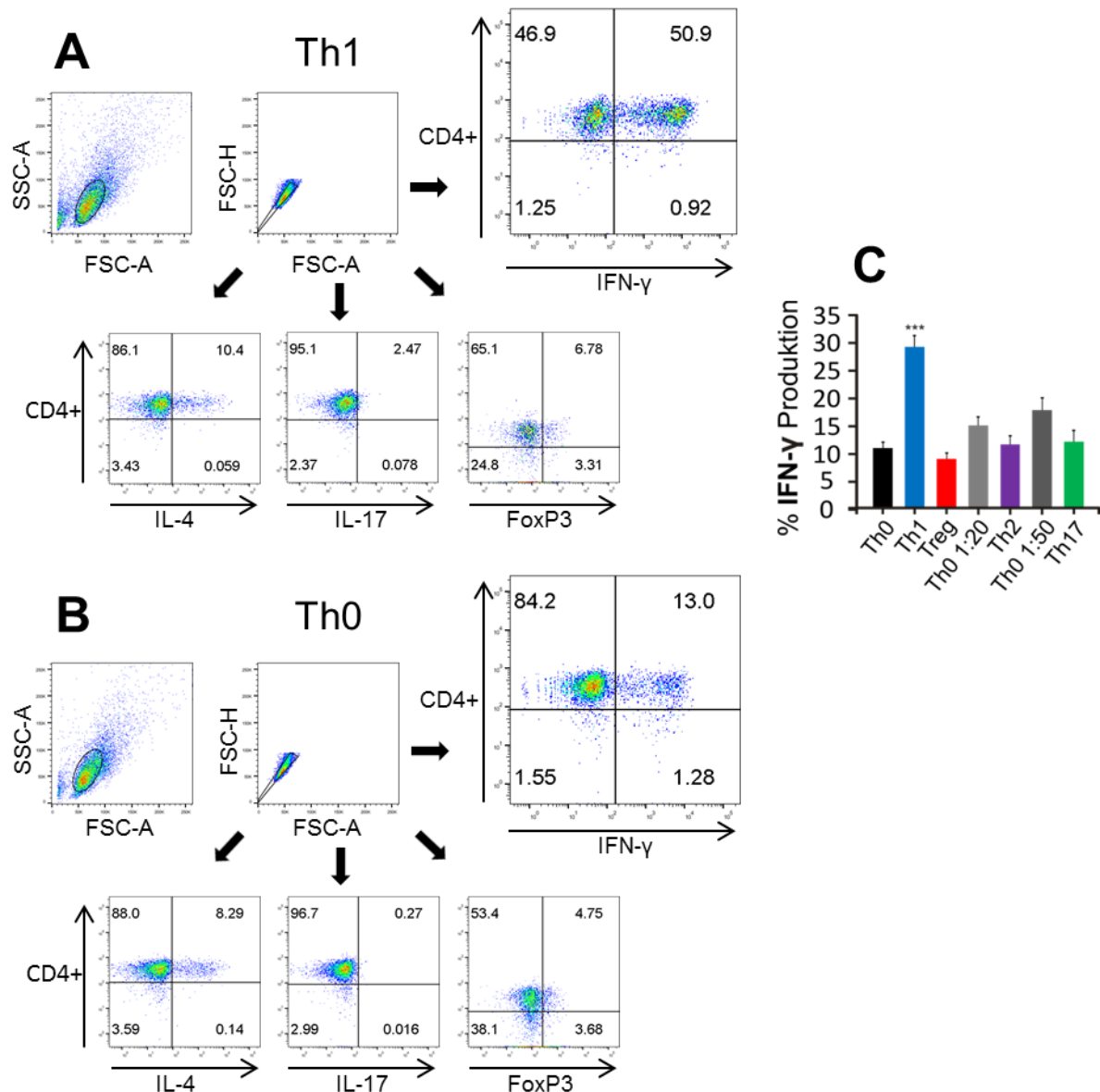


Abbildung 13: Zytokinprofil in Th1 mit zugehöriger Kontrolle Th0 polarisiert unter Polarisierungsbedingung VI (Tag 7). A: Zytokinprofil Th1, B: Zytokinprofil Th0, (Repräsentative Abbildungen). C: Mittlerer Anteil IFN-γ produzierender CD4⁺ Subtypen Th0, Th1, Treg, Th0 1:20, Th2, Th0 1:50, Th17. (n = 35 Spender)

Durch die Optimierung des Polarisierungsprotokolls konnten unter Polarisierungsbedingung VI CD4⁺ Zellen zu Th1 Zellen *in-vitro* polarisiert werden. Th1 produzierten ihr Signaturzytokin IFN-γ spezifisch und signifikant in großen Mengen (Abbildung 13A). Im Mittelwert produzierten 30 % der Th1 Zellen an Tag 7 IFN-γ und zeigten somit eine signifikante Hochregulation der IFN-γ Produktion im Vergleich zur Kontrolle Th0 und den CD4⁺ Subtypen Th2, Th17 und Treg (Abbildung 13B,C). Parallel dazu war die Produktion an IL-4, IL-17 und FoxP3 gering (Abbildung 13A).

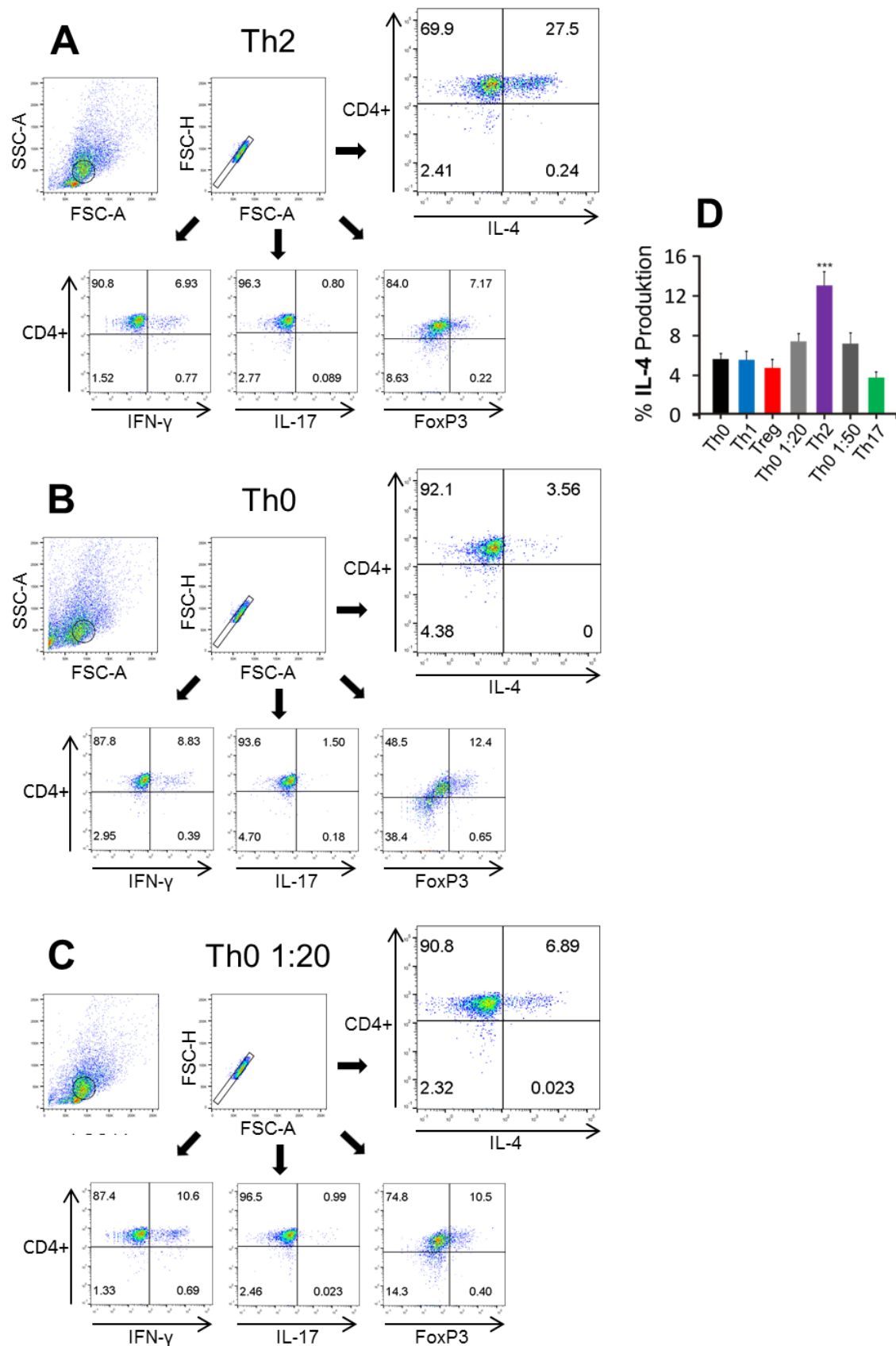


Abbildung 14: Zytokinprofil in Th2 mit zugehörigen Kontrollen Th0 und Th0 1:20 polarisiert unter Polarisierungsbedingung VI (Tag 7). A: Zytokinprofil Th2, B: Zytokinprofil Th0, C: Zytokinprofil Th0 1:20 (Repräsentative Abbildungen). D: Mittlerer Anteil IL-4 produzierender CD4⁺ Zellen Th0, Th1, Treg, Th0 1:20, Th2, Th0 1:50, Th17. (n = 23 Spender)

Unter Polarisierungsbedingung VI produzierten Th2 ihr Signaturzytokin IL-4 spezifisch und signifikant (Abbildung 14A). 13 % der Th2 Zellen produzierten an Tag 7 IL-4 (Abbildung 14C) bei geringer Produktion von IFN- γ , IL-17 und FoxP3 (Abbildung 14A). Im Vergleich zur Kontrolle Th0 (Abbildung 14B) und den CD4⁺ Subtypen Th1, Th17 und Treg zeigten Th2 eine spezifische und signifikante Hochregulation von IL-4. In der Bead Kontrolle Th0 1:20 war die IL-4 Produktion mit knapp 8 % etwas höher als in Th0, Th1, Th17 und Treg (maximal 6 %), jedoch immer noch signifikant kleiner als in Th2.

An Tag 7 wiesen Th17 unter Polarisierungsbedingung VI im Mittelwert eine signifikant größere Population an IL-17-produzierenden Zellen auf (3,9 %) als die Kontrolle Th0 (Abbildung 15A, B). Parallel dazu war die Produktion von IFN- γ , IL-17 und FoxP3 vergleichbar zur Kontrolle. Im Vergleich zu Th0 (Abbildung 15B, D) zeigten Th17 eine spezifische und signifikante Hochregulation von IL-17. Verglichen mit der Bead Kontrolle Th0 1:50 (Abbildung 15C, D) war die Produktion von IL-17 bei einem Mittelwert von 5,6 % höher als in Th17 Zellen. In Th2 und Treg war eine Tendenz zu einer geringeren Menge an IL-17 produzierenden Zellen auszumachen, diese erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. Verglichen mit Th0 war die IL-17 produzierende Population in Th17 zwar signifikant höher, aber nicht gegenüber den anderen CD4⁺ Subtypen. Unter Polarisierungsbedingung VI war es somit nicht möglich eine optimale *in-vitro* Polarisierung humaner Th17 in jedem Donor zu erzielen. Insgesamt war die Variabilität der Th17 Polarisierung sehr hoch. Aus diesem Grunde wurde von Donor zu Donor entschieden, ob die polarisierten Th17 Zellen für Experimente geeignet waren oder nicht.

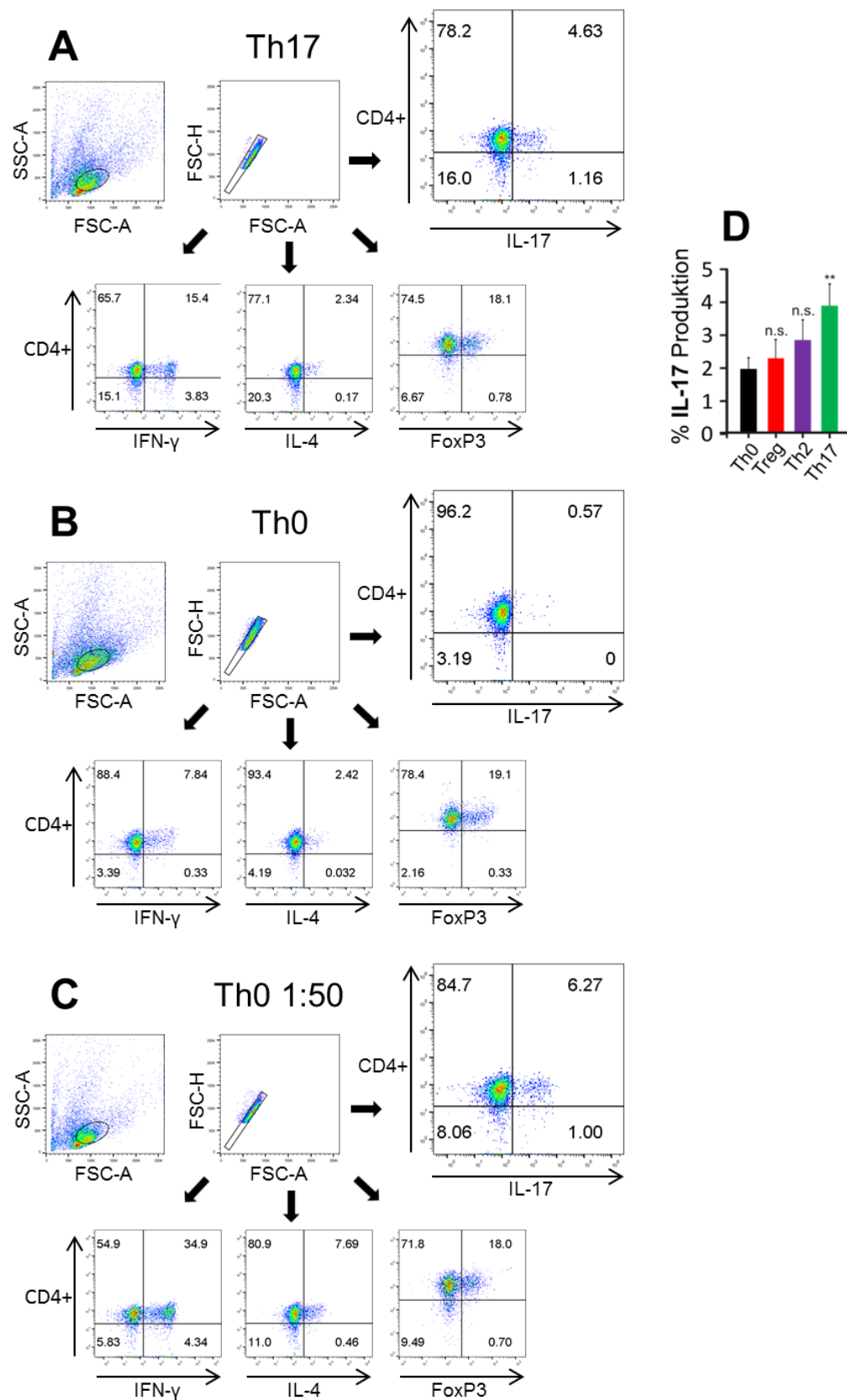


Abbildung 15: Zytokinprofil in Th17 mit zugehörigen Kontrollen Th0 und Th0 1:50 polarisiert unter Polarisierungsbedingung VI (Tag 7). A: Zytokinprofil Th17, B: Zytokinprofil Th0, C: Zytokinprofil Th0 1:50 (Repräsentative Abbildungen). D: Mittlerer Anteil IL-17 produzierender CD4⁺ Zellen Th0, Th1, Treg, Th0 1:20, Th2, Th0 1:50, Th17 (n = 19)

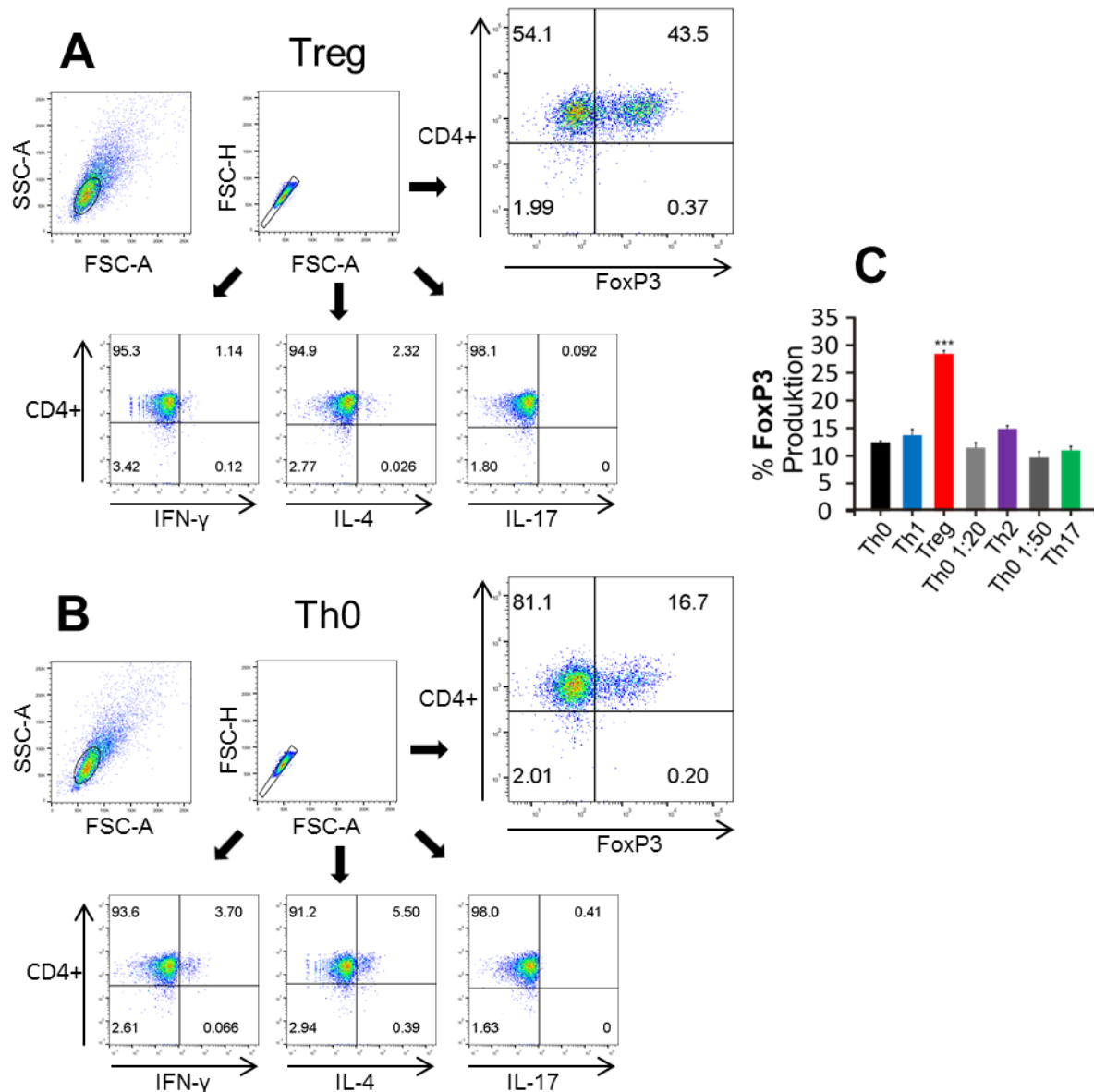


Abbildung 16: Zytokinprofil in Treg mit zugehöriger Kontrolle Th0 polarisiert unter Polarisierungsbedingung VI (Tag 7). A: Zytokinprofil Treg, B: Zytokinprofil Th0, (Repräsentative Abbildungen). C: Mittlerer Anteil FoxP3 produzierender CD4⁺ Zellen Th0, Th1, Treg, Th0 1:20, Th2, Th0 1:50, Th17. (n = 34)

Im Vergleich zur Kontrolle Th0 und den CD4⁺ Subtypen Th1, Th2 und Th17 (Abbildung 16C) zeigten Treg eine spezifische und signifikante Hochregulation von FoxP3. Treg produzierten ihren Signaturtranskriptionsfaktor FoxP3 spezifisch und signifikant in großen Mengen. (Abbildung 16A). Im Mittelwert produzierten 28,5 % der Treg Zellen an Tag 7 FoxP3 (Abbildung 16C). Die geringen Mengen an IFN- γ -, IL-4-, und IL-17-produzierenden Zellen waren vergleichbar mit den Mengen in den Kontrollzellen Th0 (Abbildung 16A, B).

Durch die Optimierung des Polarisierungsprotokolls konnten unter Polarisierungsbedingung VI CD4⁺ Zellen *in-vitro* zu regulatorischen T-Zellen polarisiert werden.

6.2 Charakterisierung der Kalziumsignale *in-vitro* polarisierter CD4⁺ T-Zell Subtypen

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Kalziumsignale der CD4⁺ T-Zell Subtypen genauer charakterisiert, da bereits geringe Änderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer differentiellen Genexpression führen können. Über die Aktivierung des T-Zell Rezeptors kommt es zu einer zytosolischen Erhöhung des *second messengers* Kalzium mittels des Mechanismus des speichergesteuerten Kalziumeinstroms (SOCE), vermittelt über das Aktivatormolekül STIM und das Kalziumkanal formende Molekül Orai. Dauer, Amplitude und Kinetik des Kalziumsignals verändern die Genexpression vieler essentieller Transkriptionsfaktoren und beeinflussen so die Expression nach Aktivierung der T-Zellen. SOCE spielt eine essentielle Rolle für Immunzellfunktionen wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Zytokinproduktion (Kim et al. 2011; Macián et al. 2002; Serfling et al. 2012), weshalb im Folgenden diese Prozesse genauer untersucht wurden.

Die in Abbildung 11 gezeigten Messungen des speichergesteuerten Kalziumeinstroms waren Teil des Optimierungsprozesses. Die Messungen wurden durchgeführt um den optimalen Zeitpunkt der Polarisierung zu finden, an dem die Zellen den signifikantesten Unterschied in ihrem Phänotyp zeigen und um zu korrelieren, ob sich die Unterschiede bereits in den verwendeten Polarisierungsbedingungen abbilden lassen. Der folgende Abschnitt zeigt eine detaillierte Studie der Kalziumphänotypen *in-vitro* polarisierter CD4⁺ T-Zell Subtypen mit dem finalen Protokoll der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Etablierung.

6.2.1 Messung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach Aktivierung über Thapsigargin

T-Zell Subtypen erfüllen verschiedene Aufgaben innerhalb des Immunsystems und sind an unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Dabei entstehen sie aus dem gleichen Vorläufer. Um zu untersuchen, inwiefern sich die T-Zell Subtypen unterscheiden, wurden diese im Zuge dieser Arbeit eingehend charakterisiert.

Um die Kalziumsignale der im ersten Teil der Arbeit etablierten T-Zell Subtypen zu charakterisieren wurde der speichergesteuerte Kalziumeinstrom mittels Ca²⁺-Imaging gemessen, um so mögliche Unterschiede im speichergesteuerten Kalziumeinstrom in den T-Zell Subtypen zu detektieren.

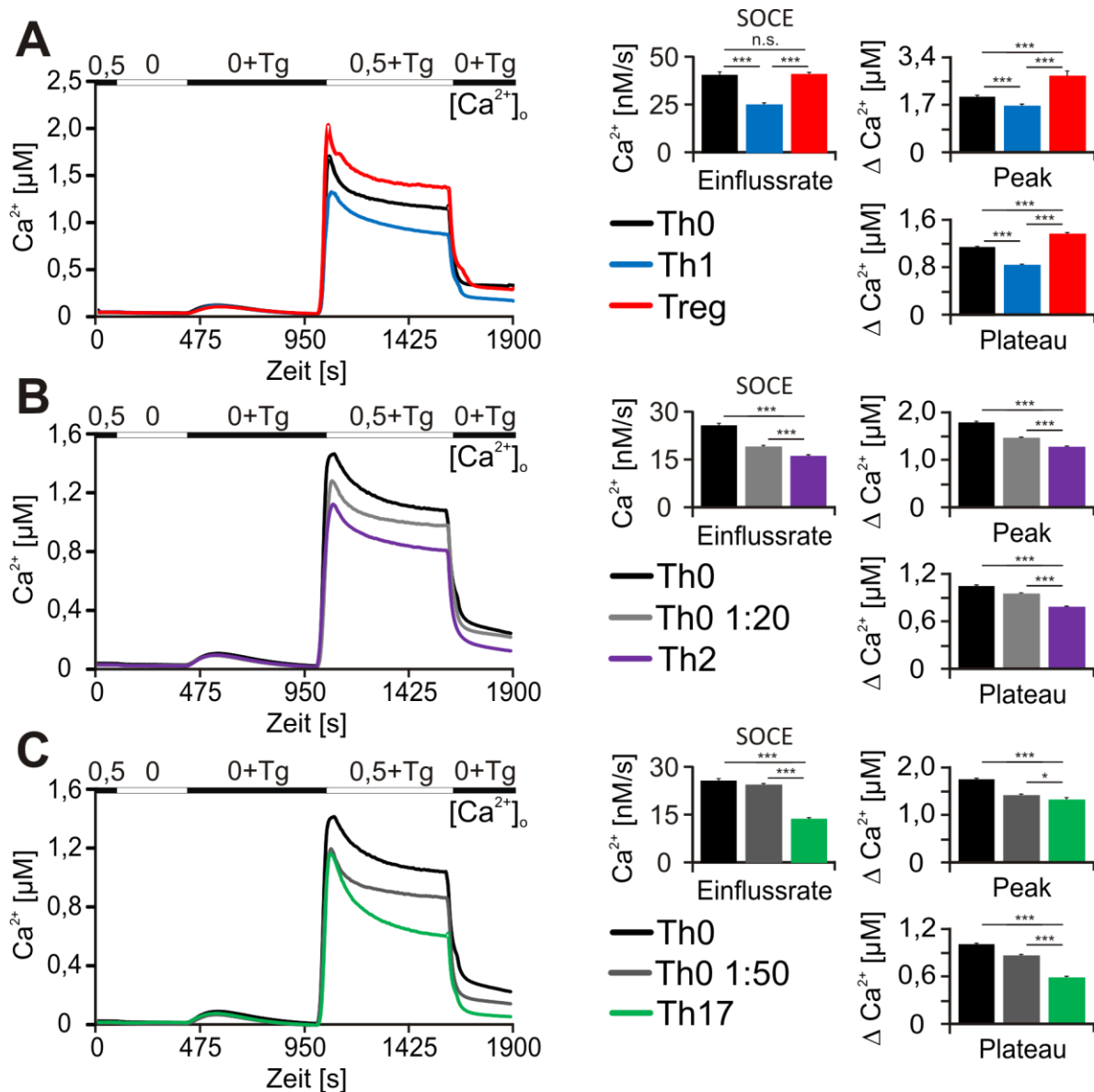


Abbildung 17: SOCE nach Polarisierung CD4⁺ Zellen in T-Zell Subtypen durch Polarisierungsbedingung VI (Tabelle 12, Donor 39-88). Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura-2 AM basiertem Ca²⁺-Imaging an Tag 7 nach Polarisierungsbeginn. Die Aktivierung des SOCE erfolgte über ein Ca²⁺-readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (Liniendiagramm). Daraus mittlere Einflussrate, mittlerer Kalziumpeak und mittleres Kalziumplateau kalkuliert (Balkendiagramme). A: n(Th0)=2142, n(Th1)=2163, n(Treg)=2130. B: n(Th0)=1811, n(Th0 1:20)=1971, n(Th2)=1999. C: n(Th0)=1811, n(Th0 1:50)=2263, n(Th17)=2134.

Alle CD4⁺ T-Zell Subtypen zeigten signifikant unterschiedliche SOCE Profile aller gemessenen Parameter. Regulatorische T-Zellen zeigten eine Zunahme von SOCE verglichen mit der Kontrolle Th0 und insgesamt den höchsten Anstieg des zytosolischen Kalzium nach SOCE-Aktivierung durch Thapsigargin (Abbildung 17A). Kalziumpeak und Plateau waren signifikant höher als in Th0 (Erhöhung auf 164 % bzw. 160 %), Th1 (Abbildung 17A), sowie Th2 und Th17 (Abbildung 17B; C). Th1 Zellen wiesen einen im Vergleich zu Th0 Zellen und regulatorischen T-Zellen reduzierten speichergesteuerten

Kalziumeinstrom auf. Im Vergleich zur Th0 Kontrolle war in Th1 Zellen sowohl die Einflussrate signifikant langsamer (61 %), als auch Kalzium Peak (84 %) und Plateau (74 %) verkleinert (Abbildung 17A). Verglichen mit Th2 und Th17 Zellen (Abbildung 17B, C) waren Einflussrate, Peak und Plateau in Th1 signifikant größer.

Th2 Zellen zeigten ebenfalls einen reduzierten speichergesteuerten Kalziumeinstrom verglichen mit der Kontrolle Th0, wobei die Unterschiede in Einflussrate, Peak und Plateau signifikant waren (Abbildung 17B). Die Einflussrate war in Th2 auf 63 % verlangsamt, Kalziumpeak auf 71 % und Kalziumplateau auf 74 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Bead Kontrolle Th0 1:20 zeigte einen mittleren Phänotyp zwischen Th0 und Th2, mit signifikanten Unterschieden in allen quantifizierten Parametern.

Th17 Zellen zeigten den kleinsten speichergesteuerten Kalziumeinstrom nach Aktivierung mit Thapsigargin (Abbildung 17C). Die Einstromrate war signifikant langsamer als in Th0 und insgesamt auch langsamer als in den Subtypen Th1, Treg und Th2. Auch das Kalziumplateau der Th17 Zellen war signifikant verkleinert (64 %) (Abbildung 17C), ebenso wie der Kalziumpeak (92 %), jedoch verglichen mit Th2 (Abbildung 17 B) vergrößert. Zusammen mit dem stärker abfallenden Plateau ergab sich für Th17 eine charakteristische Kalzium-Signatur nach SOCE-Aktivierung mit Thapsigargin, die sich von den anderen Subtypen sowohl in Größe als auch in der Form unterscheidet. Die Bead Kontrolle Th0 1:50 zeigte, ähnlich wie bei Th2 (Abbildung 17B.1) einen intermediären Kalziumphänotyp zwischen Th0 und Th17.

Insgesamt war festzustellen, dass die *in-vitro* polarisierten CD4⁺ Subtypen nach Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin unterschiedliche und charakteristische Kalziumphänotypen aufwiesen. Unterschiede waren sowohl im Vergleich zur Kontrolle Th0 festzustellen, als auch zwischen den einzelnen Subtypen. Treg zeigten die größte Erhöhung des zytosolischen Kalziums nach SOCE Aktivierung, gefolgt von Th1 und Th2. Die geringste Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration war bei Th17 zu beobachten, dieser Subtyp wies jedoch eine besonders charakteristische Form des Verlaufs der intrazellulären Kalziumkonzentration auf, mit einem verhältnismäßig hohem Kalziumpeak im Vergleich zum stark reduzierten Plateau. Diese Ergebnisse weisen auf eine differentielle Regulation des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in *in-vitro* polarisierten CD4⁺ Subtypen hin. Welche Faktoren diese unterschiedlichen Kalziumphänotypen regulieren könnten, wurde in den folgenden Kapiteln untersucht.

6.2.2 Quantifizierung der Expression der SOCE-Komponenten

Um zu untersuchen, ob eine Erklärung für die charakteristischen Kalziumphänotypen der CD4⁺ T-Zell Subtypen in den unterschiedlichen Expressionsleveln der SOCE Gene zu finden

ist, wurden diese auf mRNA- und Proteinebene mittels quantitativer Real-Time PCR, Western Blot beziehungsweise Durchflusszytometrie bestimmt.

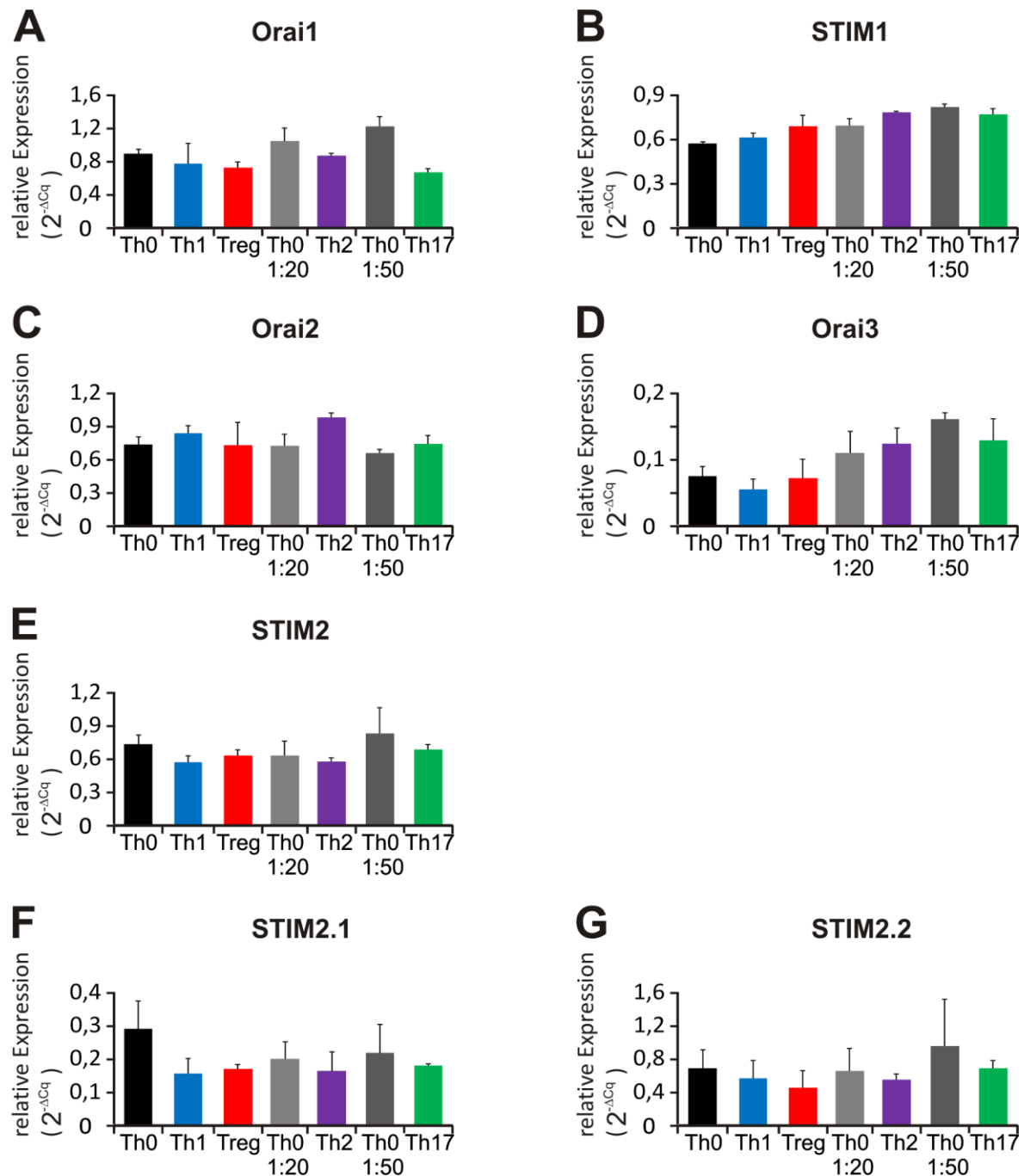


Abbildung 18: Relative Expressionsmenge der SOCE Gene. Die Balkendiagramme zeigen die mittleren mRNA Level nach 7-tägiger Polarisation in Th1, Treg, Th2, Th17, der Kontrolle Th0 und den Bead Kontrollen Th0 1:20 und Th0 1:50, normiert auf das Haushaltsgen TBP. (n=2) (durchgeführt von Gertrud Schwär). A: Orai 1 Expressionslevel, B: STIM1, C: Orai2 Expressionslevel, D: Orai3 Expressionslevel, E: STIM2 Gesamtprotein Expressionslevel, F: STIM2.1 Expressionslevel, G: STIM2.2 Expressionslevel.

Auf mRNA Ebene konnten in den CD4⁺ T-Zell Subtypen keine Unterschiede in den Expressionsmengen der SOCE Komponenten Orai1 und STIM1, sowie deren Homologe

Orai2, Orai3 und STIM 2 detektiert werden. Auch die Expression der STIM2 Spleißvarianten STIM2.1 und STIM2.2 unterschied sich nicht von der Kontrolle Th0 oder den Bead Kontrollen Th0 1:20 und Th0 1:50 (Abbildung 18).

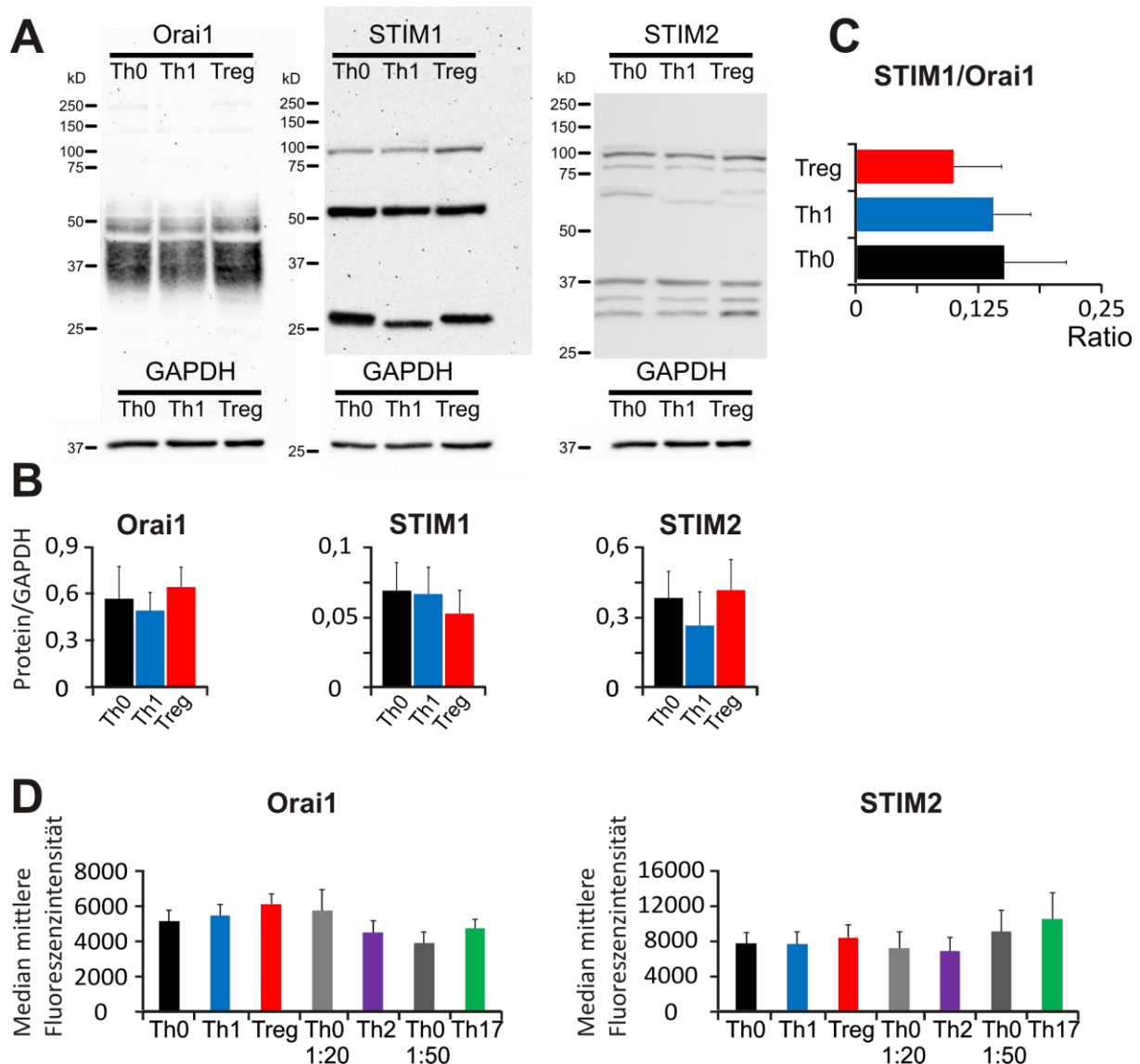


Abbildung 19: Bestimmung der relativen Proteinmenge der SOCE Komponenten in Th0, Th1 und Treg durch Western Blot und Durchflusszytometrie: A - C: CD4⁺ T-Zell Subtypen wurden 7 Tage nach Polarisierungsbeginn lysiert, Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels Antikörper gegen Orai 1 (Banden auf Höhe von 35-50kDa), STIM1 (Bande auf Höhe von 84kDa) und STIM2 (Bande auf Höhe von 100kDa) und GAPDH (37kDa) detektiert. A: Repräsentativer Western Blot mit den Bandenmustern von verwendetem α -Orai1, α -STIM1 und α -STIM2, sowie korrespondierendem α -GAPDH B: Die Quantifizierung der Westernblots für Orai1, STIM1 und STIM2. Berechnung des Mittelwertes nach densitometrischer Bestimmung der Banden. Die graphischen Darstellung erfolgte durch Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH (n=4). C: Quantifizierung der Ratio von STIM1 zu Orai1 nach Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH. D: Durchflusszytometrische Bestimmung der Orai1 und STIM1 produzierenden Zellpopulationen in CD4⁺ T-Zellsubtypen. Die Zellen wurden 7 Tage nach Beginn der Polarisierung geerntet, fixiert permeabilisiert und mittels Antikörper gegen Orai 1 und STIM1 durchflusszytometrisch detektiert. Für die graphische Darstellung wurde der Median der mittleren Fluoreszenz Intensität quantifiziert. n (Th0) = 13, n (Th1) = 6, n (Treg) = 6, n (Th0 1:20) = 9, n (Th2) = 7, n (Th0 1:50) = 4, n (Th17) = 9.

Auch auf Proteinebene konnten zwischen Th1 und Treg sowie der Kontrolle Th0 keine signifikanten Unterschiede in der relativen Proteinmenge der SOCE Komponenten Orai1, STIM1 und STIM2 gefunden werden. Zusätzlich zu der erwarteten STIM2 Bande auf Höhe von ~98 kDa waren noch weitere Banden auf Höhe von ~81 kDa und kleiner sichtbar (Abbildung 19A). In der Ratio STIM1/Orai1 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Th0, Th1 und Treg (Abbildung 19B). Auch die mittels durchflusszytometrischer Färbungen bestimmten Orai1 und STIM1 Level wiesen innerhalb der CD4⁺ Subtypen und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 19C). Die durch Ca²⁺-Imaging detektierten Kalziumphänotypen konnten somit nicht auf die hier gefundenen relativen Expressions- und Proteinmengen der SOCE Komponenten zurückgeführt werden.

6.2.3 Einfluss des Th1-polarisierenden Zytokin IL-12 auf unstimulierte CD4⁺ Zellen (*untouched*)

Nach der Untersuchung der Kalziumsignale der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen fiel auf, dass Th0 und Th1 die unterschiedlichsten Kalziumprofile aufwiesen, obwohl sich das Polarisierungsmedium hauptsächlich durch die Zugabe von IL-12 unterschied, während die Stimulusstärke gleich war (Bead:Zell Ratio 1:10) (Tabelle 12). Deswegen sollte die Wirkung des Zytokins IL-12 auf das Kalziumsignal isoliert betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde die CD4⁺ Gesamtpopulation (*untouched*) nach Isolation für 5 Tage mit IL-12 behandelt, um zu untersuchen ob bereits IL-12 alleine eine Auswirkung auf die Kalziumantwort nach Aktivierung mit Thapsigargin zeigt. Zusätzlich wurden die mRNA Level des Th1 spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet bestimmt, um zu verifizieren ob die Unterschiede der Kalziumsignale darauf beruhen, dass IL-12 die Zellen bereits in Richtung Th1 polarisiert sind.

Die Behandlung der CD4⁺ Zellen (*untouched*) mit IL-12 bewirkte eine Erniedrigung des Kalziumsignals verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Alle gemessenen Parameter (Einflussrate, Peak und Plateau) waren signifikant erniedrigt (Abbildung 20A). Dabei war die Einflussrate 25 % langsamer, der Kalziumpeak um 27 % und das Plateau um 35 % verkleinert. Zusätzlich war eine signifikante Erhöhung der T-bet Produktion auf mRNA Ebene in den IL-12 behandelten Zellen festzustellen (Abbildung 20B), was darauf hinweist, dass sich der beobachtete Phänotyp von Th1 zumindest teilweise durch einen Effekt von IL-12 erklären lässt.

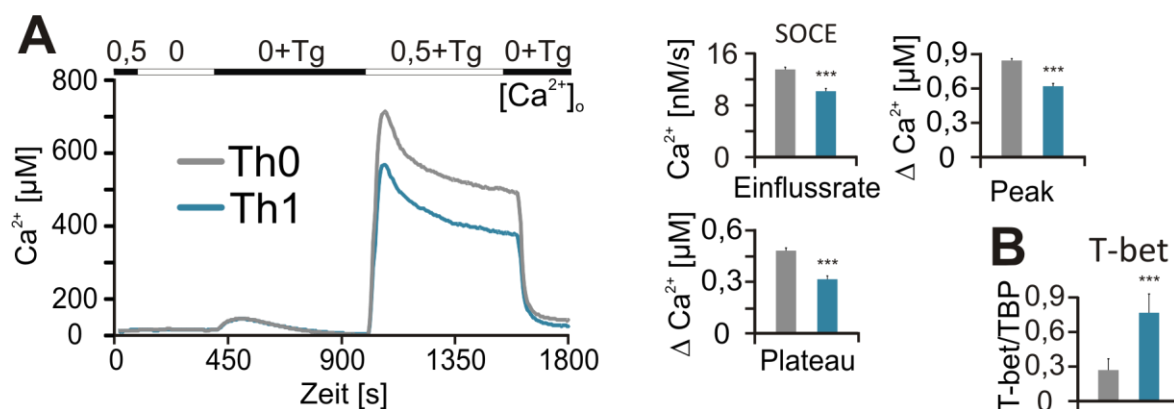


Abbildung 20: SOCE nach Behandlung von CD4⁺ Zellen (untouched) mit IL2 (10 ng/ml) und IL12 (20 ng/ml) für 5 Tage. Die Kontrollzellen wurden ohne IL-12 kultiviert. A: Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura 2 AM basierendem Ca²⁺-Imaging an Tag 5 nach Start der Inkubation. Die Aktivierung des SOCE erfolgte über ein Ca²⁺-readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (Liniendiagramm). Daraus mittlere Einflussrate, mittlerer Kalziumpeak und mittleres Kalziumplateau kalkuliert (Balkendiagramme). n(CD4⁺-IL-12) = 773, n(CD4⁺+IL-12) = 308. B: Mittlere mRNA Expressionslevel von T-bet nach 5-tägiger Inkubation mit/ohne IL-12 (20 ng/ml). Normierung auf das Haushaltsgen TBP. (n=5) (durchgeführt von Gertrud Schwär).

6.2.4 Einfluss der Spleißvariante STIM2.1 auf die differenzielle Regulation der Kalziumphänotypen der CD4⁺ T-Zell Subtypen

Um die erheblichen Unterschiede der in Kapitel 6.2.1 beschriebenen Kalziumsignale zwischen den Subtypen zu erklären, wurde die Frage aufgeworfen, ob die kürzlich identifizierte Spleißvariante von STIM2 (STIM2.1) eine differentielle Rolle in den *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen spielt. Der Einfluss der Spleißvariante auf die Kalziumphänotypen wurde mittels siRNA gegen STIM2.1 untersucht.

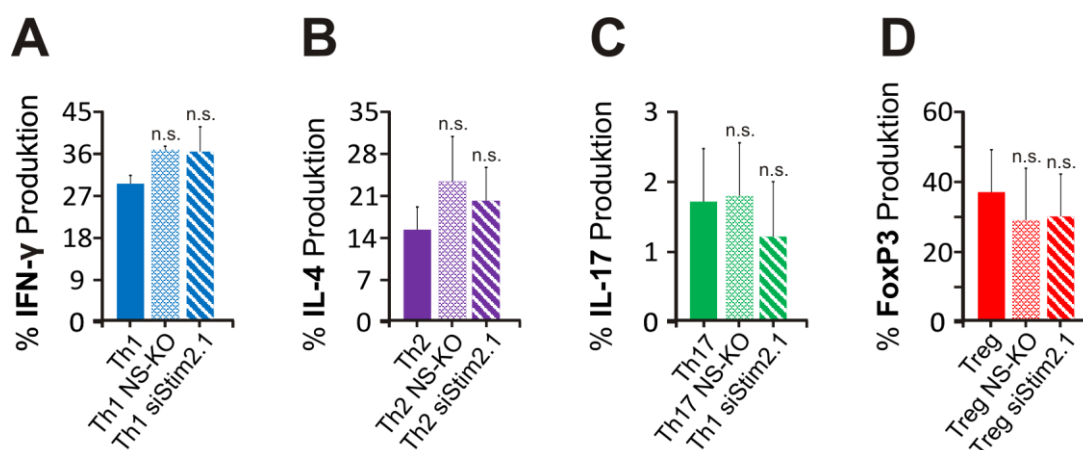


Abbildung 21: Bestimmung der Signaturzytokin produzierenden innerhalb der CD4⁺ T-Zellsubtypen nach Transfektion mit siRNA gegen STIM2.1 und NS-Kontrolle. Die Zellen wurden 7 Tage nach Beginn der Polarisierung geerntet, fixiert permeabilisiert und mittels Antikörper gegen IFN-γ (A), IL-4 (B), IL-17 (C) und FoxP3 (D) durchflusszytometrisch detektiert. Die graphische Darstellung gibt den Prozentsatz an Zytokin-produzierenden Zellen an. (n (Th1, Treg) = 2; n (Th2, Th17) = 3).

Die Zellen wurden am Tag 4 nach Polarisierungsbeginn transfiziert und 72h später, an Tag 7, mittels Ca^{2+} -Imaging gemessen. Parallel wurden die Zytokinlevel der Subtypen bestimmt, um sicherzustellen, dass die Transfektion keinen Einfluss auf die Polarisierung hatte. Weder die Transfektion (Transfektionskontrolle mit non-silencing siRNA (NS-KO)) noch die Herunterregulation der dominant negativen Spleißvariante von STIM2 hatte einen signifikanten Effekt auf die Zytokinproduktion. Somit scheinen diese Faktoren keinen Einfluss auf das Schicksal der *in-vitro* polarisierten CD4^+ T-Zell Subtypen zu haben (Abbildung 21).

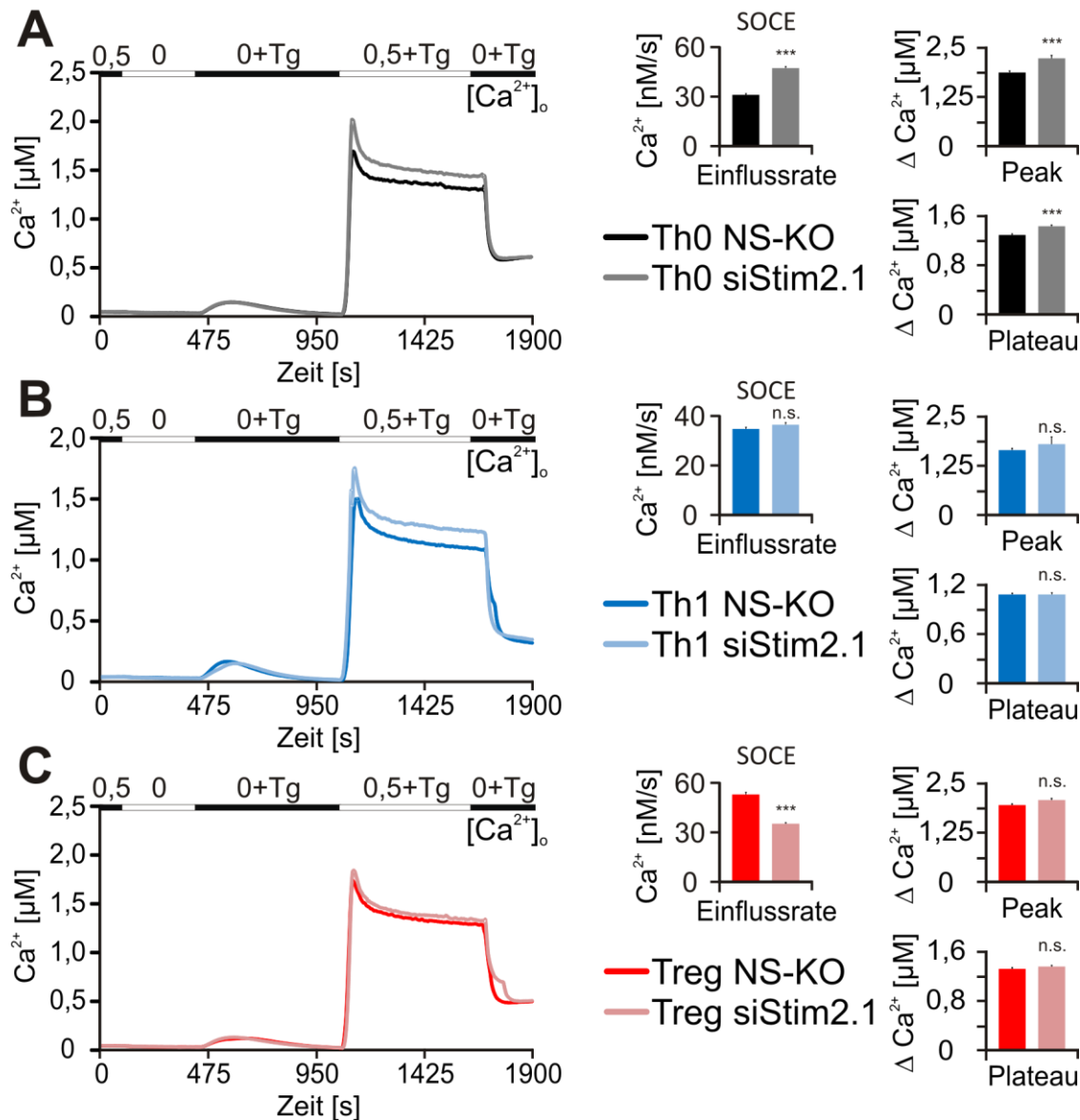


Abbildung 22: SOCE in Th1, Treg und Kontrollzellen Th0 nach Herunterregulation der dominant negativen Spleißvariante STIM2.1. Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura 2 AM basiertem Ca^{2+} -Imaging an Tag 7 nach Polarisierungsbeginn, 72h nach Transfektion. Aktivierung SOCE erfolgte über das Ca^{2+} -readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (Liniendiagramme A-C). Daraus wurde die mittlere Einflussrate, der mittlere Kalziumpeak und das mittlere Kalziumplateau kalkuliert (Balkendiagramme A-C). n(Th0 NS-KO)= 1042, n(Th0siSTIM2.1)=1223, n(Th1 NS-KO)=892, n(Th1 siSTIM2.1)=958, n(Treg NS-KO)=1044, n(Treg siSTIM2.1)=983 von 3 unabhängigen Spendern.

Nach Herunterregulation der dominant negativen Spleißvariante in den Kontrollzellen Th0 (Abbildung 22A) zeigte sich der erwartete Anstieg des speichergesteuerten Kalziumeinstroms verglichen mit der *non-silencing* Kontrolle (NS). Ein ähnlicher Effekt wurde schon in Miederer et al. 2015 in naiven CD4⁺ Zellen beschrieben und entsteht durch die Herunterregulation des SOCE Inhibitors STIM2.1. Dies resultiert in einem signifikanten Anstieg von Einflussrate, Kalziumpeak und Plateau. In Th0 war die Einflussrate um 50 % vergrößert, Kalziumpeak um 18 % und Plateau um 10 %. Interessanterweise war dieser Effekt in Th1 und Treg nicht zu beobachten. Th1 zeigten zwar einen tendenziellen Anstieg von Rate, Peak und Plateau nach Transfektion mit siRNA gegen STIM2.1, das Signifikanzniveau konnte aber nicht erreicht werden (Abbildung 22B). Treg wies sogar eine signifikant langsamere Rate nach siRNA Behandlung verglichen mit der *non-silencing* Kontrolle auf, während Kalziumpeak und Plateau jedoch unbeeinflusst waren (Abbildung 22C). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse darauf hindeuten könnten, dass der Effekt von STIM2.1 auf SOCE kein ubiquitärer Effekt, sondern zellspezifisch sein könnte und sich in Th0, Th1 und Treg grundlegend unterscheidet.

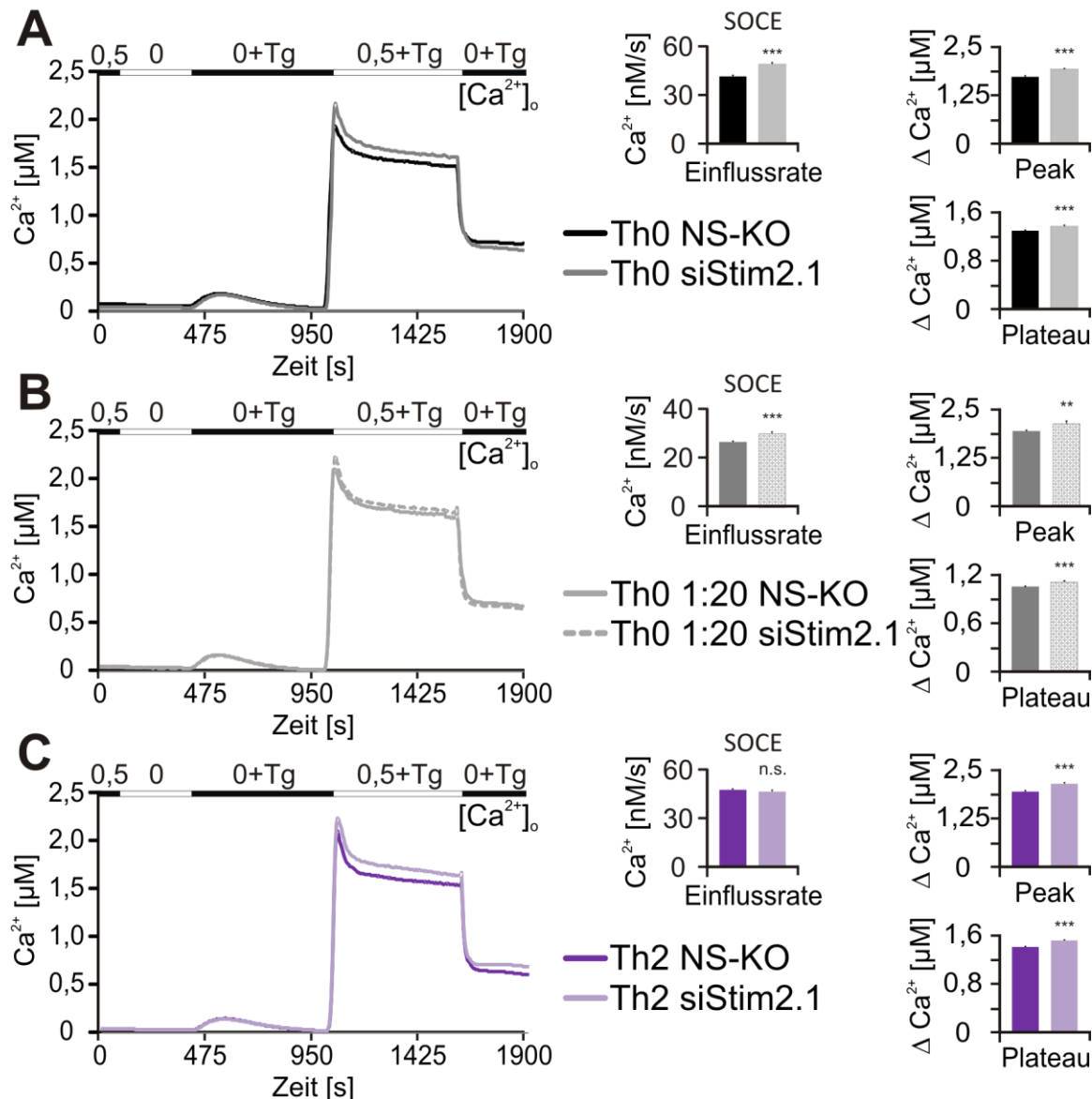


Abbildung 23: SOCE in Th2 und Kontrollzellen Th0 sowie der Bead Kontrolle Th0 1:20 nach Herunterregulation der dominant negativen Spleißvariante STIM2.1. Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura 2 AM basiertem Ca^{2+} -Imaging an Tag 7 nach Polarisierungsbeginn, 72h nach Transfektion. Aktivierung SOCE erfolgte über das Ca^{2+} -readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (Liniendiagramm A-C). Daraus wurde die mittlere Einflussrate, der mittlere Kalziumpeak und das mittlere Kalziumplateau kalkuliert (Balkendiagramme A-C). $n(\text{Th0 NS-KO}) = 1191$, $n(\text{Th0 siSTIM2.1}) = 1130$, $n(\text{Th0 1:20 NS-KO}) = 1918$, $n(\text{Th0 1:20 siSTIM2.1}) = 1888$, $n(\text{Th2 NS-KO}) = 1998$, $n(\text{Th2 siSTIM2.1}) = 1991$, aus 4-5 unabhängigen Spendern.

Auch Th2 Zellen wurden mit siRNA gegen die dominant negative Spleißvariante STIM2.1 transfiziert. Als Kontrolle wurden Th0 und die Bead Kontrolle Th0 1:20 verwendet und erneut die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration durch Ca^{2+} -Imaging gemessen. In Th2 Zellen war der zuvor in Miederer et al. (2015) beschriebene dominant negative Effekt der Variante zu beobachten. Die Herunterregulation bewirkte einen Anstieg von SOCE und eine Vergrößerung von Kalziumpeak und Plateau um 10 % bzw. um 7 % (Abbildung 23C). Die Effekte der siRNA Behandlung auf Th2 waren vergleichbar zur Kontrolle Th0 mit einer

Erhöhung um 11 % bzw. 6 % und zur Bead Kontrolle Th0 1:20 mit einer Erhöhung um 10 % bzw 6 % (Abbildung 23A,B). Dies unterscheidet Th2 zu Th1 und Treg. In letzteren beiden Subtypen konnte kein signifikanter Effekt auf SOCE nach siRNA Behandlung festgestellt werden.

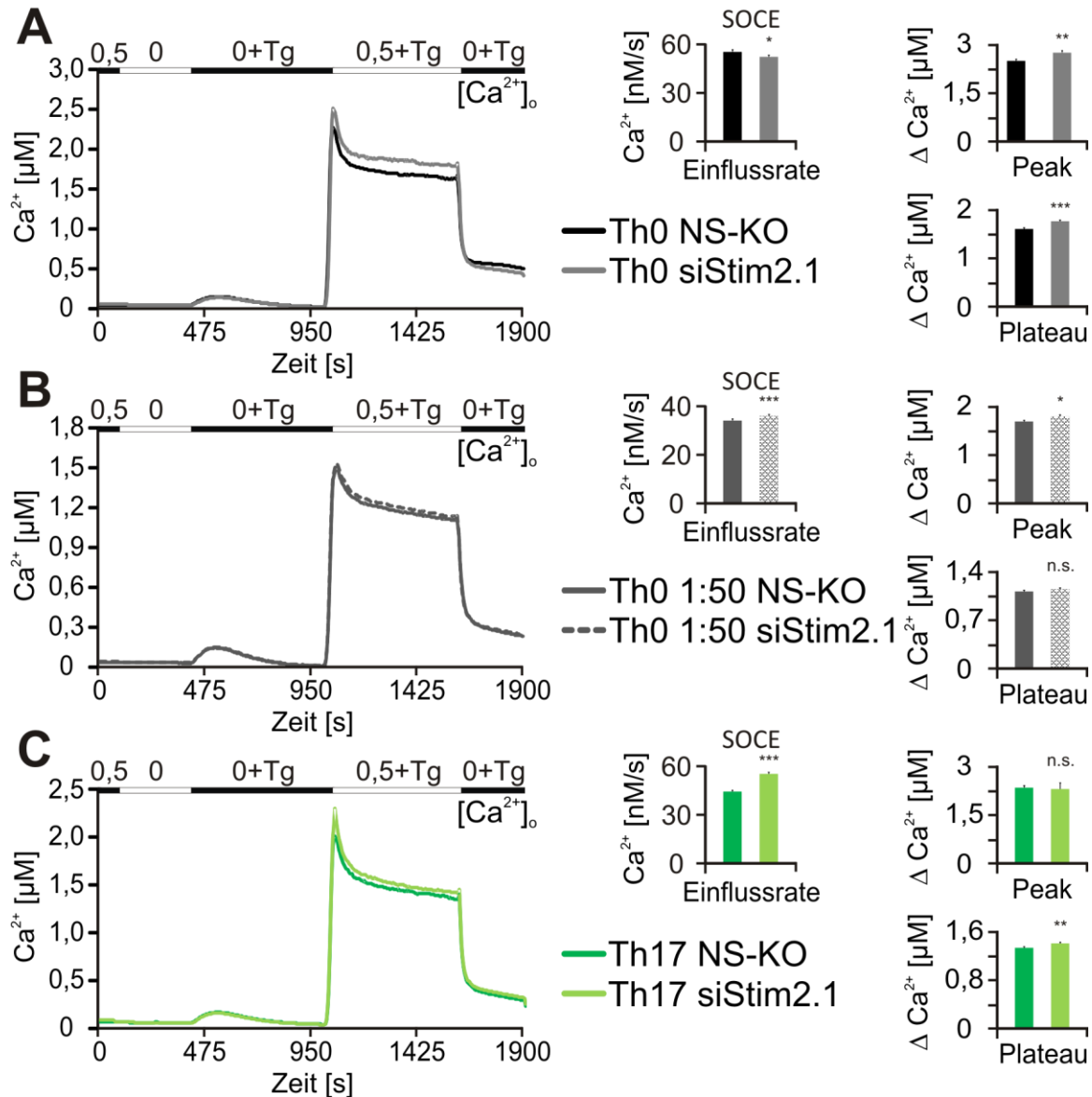


Abbildung 24: SOCE in Th17 und Kontrollzellen Th0 sowie der Bead Kontrolle Th0 1:50 nach Herunterregulation der dominant negativen Spleißvariante STIM2.1. Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura 2 AM basiertem Ca^{2+} -Imaging an Tag 7 nach Polarisierungsbeginn, 72h nach Transfektion. Aktivierung SOCE erfolgte über Ca^{2+} -readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (Liniendiagramm). Daraus wurde die mittlere Einflussrate, der mittlere Kalziumpeak und das mittlere Kalziumplateau kalkuliert (Balkendiagramme A-C). $n(\text{Th0 NS-KO}) = 1241$, $n(\text{Th0 siSTIM2.1}) = 1149$, $n(\text{Th0 1:50 NS-KO}) = 1800$, $n(\text{Th0 1:50 siSTIM2.1}) = 1491$, $n(\text{Th17 NS-KO}) = 2061$, $n(\text{Th17 siSTIM2.1}) = 1989$, von 3-5 unabhängigen Spendern

Zuletzt wurden die Kalziumprofile von Th17 nach siRNA Behandlung gegen STIM2.1 gemessen und analysiert. Th17 Zellen zeigten nach Herunterregulation einen signifikanten Anstieg der Einstromrate um 24 % und des Plateaus um 5 % (Abbildung 24C), der

Kalziumpeak unterschied sich allerdings nicht signifikant zur Kontrolle (Abbildung 24C). Die parallel gemessenen Th0 Zellen zeigten den bereits beschriebenen dominant negativen Effekt auf alle quantifizierten Parameter (Abbildung 24A). Die Bead Kontrolle Th0 1:50 zeigte eine signifikante Erhöhung von Einflussrate und Peak nach Herunterregulation von STIM2.1 (Abbildung 24B). Nur das Plateau unterschied sich nicht signifikant von der NS - Kontrolle.

Insgesamt unterschied sich der Effekt der siRNA gegen STIM2.1 innerhalb der Subtypen. Th2 und Th17 zeigten nach der Behandlung eine gleiche Tendenz wie Th0, also den erwarteten Anstieg von SOCE nach Herunterregulation der dominant negativen Variante des Aktivators STIM2. In Th1 und Treg dagegen war der speichergesteuerte Kalziumeinstrom nach STIM2.1 siRNA Behandlung kaum verändert.

6.2.5 Einfluss von Orai1 auf die differenzielle Regulation der Kalziumphänotypen der CD4⁺ T-Zell Subtypen

Ein weiterer Hinweis auf das Zustandekommen der Kalziumphänotypen könnte die Herunterregulation des Kalziumkanals Orai1 geben, einer essentiellen Komponente des speichergesteuerten Kalziumeinstroms. Einige Studien weisen bereits auf eine differentielle Rolle von Orai1 in der Differenzierung von CD4⁺ T-Zell Subtypen hin, was Orai1 zu einem potentiellen Angriffspunkt für Therapeutika im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose macht (Kim et al. 2013; Kaufmann et al. 2015). Die *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen wurden an Tag 5 nach Polarisierungsbeginn mit siRNA gegen Orai1 transfiziert. 48h später an Tag 7 wurde SOCE mittels Ca²⁺-Imaging gemessen.

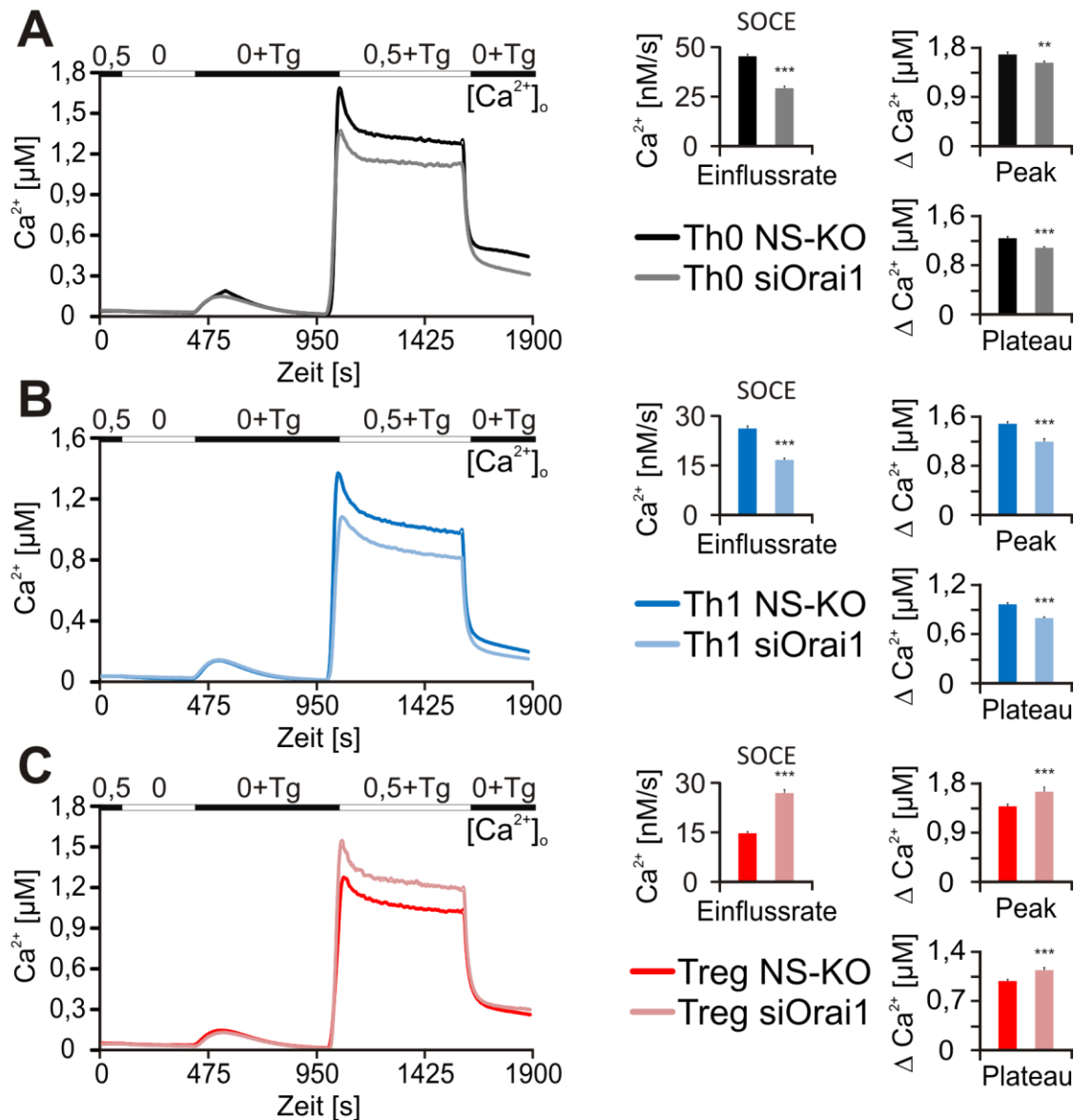


Abbildung 25: SOCE in Th1, Treg und Kontrollzellen Th0 nach Herunterregulation von Orai1. Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura 2 AM basiertem Ca^{2+} -Imaging an Tag 7 nach Polarisierungsbeginn, 48h nach Transfektion. Aktivierung SOCE erfolgte über Ca^{2+} -readdition Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (Liniendiagramm, A-C). Daraus wurde die mittlere Einflussrate, der mittlere Kalziumpeak und das mittlere Kalziumplateau kalkuliert (Balkendiagramme A-C). $n(\text{Th0 NS-KO}) = 378$, $n(\text{Th0 siOrai1}) = 533$, $n(\text{Th1 NS-KO}) = 609$, $n(\text{Th1 siOrai1}) = 640$, $n(\text{Treg NS-KO}) = 473$, $n(\text{Treg siOrai1}) = 261$, von 2 unabhängigen Spendern.

Nach Herunterregulation des Kalziumkanals Orai1, kam es in Th0 und Th1 Zellen nach Aktivierung mit Thapsigargin zu der erwarteten Reduktion des speichergesteuerten Kalziumeinstroms (Abbildung 25A, B), da Orai1 den Kalziumkanal bildet (Feske et al. 2006; Vig et al. 2006; Zhang et al. 2006). Einflussrate, Kalziumpeak und Kalziumplateau waren in Th0 und Th1 signifikant verkleinert (Abbildung 25A, B). In Th0 war die Rate auf 64 %, der Kalziumpeak auf 90 % und das Plateau auf 87 % erniedrigt. In Th1 waren die Parameter durch die Orai1 siRNA zu einem ähnlichen Grad reduziert. Die Einflussrate war auf 63 %

verkleinert, Peak und Plateau auf 80 % bzw. 82 %. Überraschenderweise hatte die Herunterregulation von Orai 1 in regulatorischen T-Zellen den umgekehrten Effekt (Abbildung 25C). Sowohl Einflussrate (180 %), als auch Kalziumpeak (119 %) und Plateau (115 %) waren signifikant erhöht. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass SOCE in Treg nicht oder nicht ausschließlich von Orai1 getragen ist. Möglicherweise spielen hier vermehrt andere Kanäle eine Rolle.

6.2.6 Einfluss spannungsgesteuerter L-Typ Kalzium Kanäle (Ca_v) auf SOCE in $CD4^+$ T-Zell Subtypen.

Die Rolle von spannungsgesteuerten Kalzium Kanälen (Ca_v) bei speichergesteuertem Kalziumeinstrom ist immer noch Gegenstand vieler Debatten (Rao & Hogan 2009; Hogan et al. 2010; Niemeyer & Hoth 2011; Feske et al. 2012). Um zu klären, ob spannungsgesteuerte Kalzium Kanäle zu der differenziellen Regulation des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in $CD4^+$ Subtypen beitragen, wurden die *in-vitro* polarisierten Subtypen Th1, Th2, Treg und die Kontrolle Th0 mit einer Hoch-Kalium Lösung (verändert nach Park et al. 2010) perfundiert. Die Verwendung der Hoch-Kalium Lösung zeigt, ob es durch Depolarisation zu einer Öffnung der spannungsgesteuerten Kalzium Kanäle und damit einhergehend zum Kalziumeinstrom durch Ca_v und einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration kommt.

6.2.6.1 Depolarisation von CD4⁺ Zellen mit Hoch-Kalium Lösung

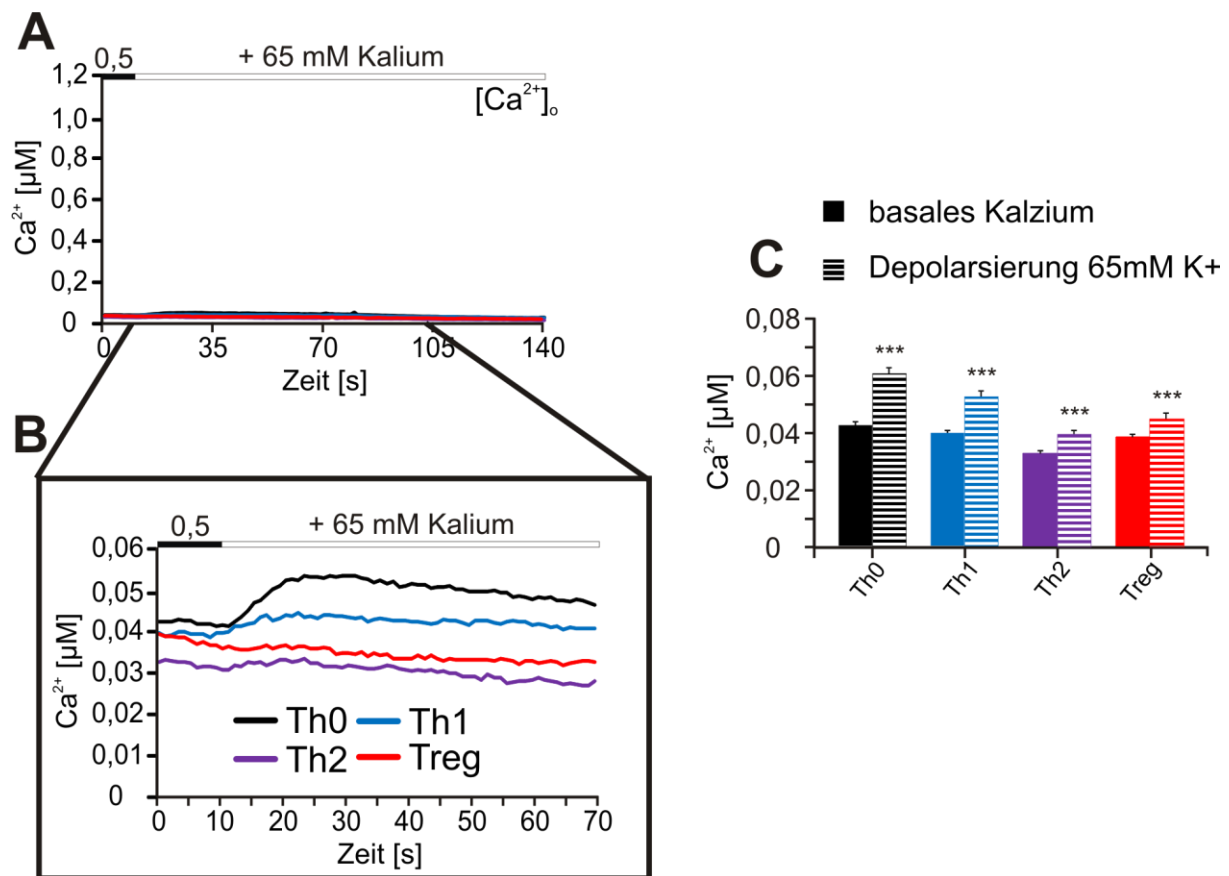


Abbildung 26: Darstellung der Erhöhung des zytosolischen Kalziums nach Depolarisation mit einer 65mM Kalium Lösung. A: Mittlerer zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) kalibriert auf Kalziumkonzentrationen (Liniendiagramm). B: Vergrößerung des Bereichs der Applikation der Hoch-Kalium Lösung (65mM). C: Quantifizierung der zytosolischen Kalziumkonzentrationen vor (ausgefüllte Balken) und nach (gemusterte Balken) Depolarisation mit Kalium aus dem mittleren zeitlichen Verlauf der Ratio (F340/F380) kalibriert auf Kalziumkonzentrationen (Liniendiagramm). 1 Messung: n(Th0) = 219, n(Th1) = 229, n(Th2) = 231, n(Treg) = 253.

Wie in Abbildung 26A sichtbar, hatte die Depolarisation nur minimale Effekte auf das basale Kalzium. Durch eine Vergrößerung wurden die geringen Effekte sichtbar gemacht (Abbildung 26B). Die Quantifizierung (Abbildung 26C) zeigte den größten Anstieg des basalen Kalziums nach Depolarisation in Th0 Zellen. Hier stieg das Kalzium um ungefähr 43 % (von 43 nM auf 62 nM). In Th1 wurde ein Anstieg nach Depolarisation von 40 nM auf 53 nM (~33 %), in Th2 von 32 nM auf 39 nM (~18 %) und in Treg Zellen von 38 nM auf 45 nM (~18 %) beobachtet. Da der Effekt auf das basale Kalzium in den verschiedenen CD4⁺ T-Zell Subtypen sehr klein war und nur eine geringe direkte Aktivität von spannungsgesteuerten Kanälen durch die Depolarisation beobachtet werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob spannungsgesteuerte Kalziumkanäle eine indirekte, möglicherweise regulatorische Rolle auf den Kalziueinstrom in die T-Zellsubtypen haben. Aus diesem Grund wurde der Einfluss pharmakologischer Inhibition von L-Typ Ca_v -Kanälen auf den Thapsigargin-induzierten Kalziueinstrom untersucht.

6.2.6.2 Einfluss des L-Typ Ca_v Blockers Nimodipine auf SOCE in CD4^+ T-Zell Subtypen

Wie in vorangegangenen Versuchen, wurden Th0, Th1, Th2 und Treg Zellen über 7 Tage polarisiert und der speichergesteuerte Kalziumeinstrom mit Hilfe des *Ca^{2+} -readdition* Protokolls an Tag 7 untersucht. Nach der Hälfte der Plateauphase wurde 2 μM Nimodipine, ein L-Typ Ca_v -Kanal Blocker, bzw. DMSO in 0,5 mM CaCl_2 Lösung appliziert.

In den einzelnen Subtypen zeigte der L-Typ Ca_v -Blocker Nimodipine kaum inhibitorische Wirkung auf das Kalziumplateau. Im mittleren zeitlichen Verlauf (Abbildung 27) war kaum eine Veränderung im Vergleich mit den Kontrollzellen (DMSO) zu erkennen. In der Quantifizierung der Inhibition durch 2 μM Nimodipine zeigten Th0 im Mittelwert eine Inhibition des Kalziumsignals um 2 % (Abbildung 27A), Th1 um 5 % (Abbildung 27B) und Treg um 4 % (Abbildung 27D). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Kalziumsignale von Th2 Zellen möglicherweise sensibler gegenüber L-Typ Ca_v Kanal Antagonisten sind als die anderen CD4^+ T-Zell Subtypen. Aus diesem Grund wurde für Th2 Zellen eine weitere Bedingung untersucht. Die Th2 Population wurde hierfür in zwei Gruppen unterteilt, um eine unterschiedliche Blocker-Behandlung zu testen. Zum einen wurde eine langfristige Inkubation untersucht, indem die Zellen über Nacht (12 h) mit 2 μM Nimodipine inkubiert wurden, zum anderen wurden die Zellen akut (Applikation auf Plateau) mit 2 μM Nimodipine behandelt (Abbildung 27C). Die akute Applikation von Nimodipine bewirkte eine Reduktion des Kalziumplateaus um 4 %. Durch längere Inkubation konnte eine signifikante Reduktion um 17 % erreicht werden. Obwohl die Effekte von 2 μM Nimodipine auf das Kalziumplateau in allen Subtypen außer auf Th0 Zellen signifikant waren, handelt es sich hierbei um sehr kleine Effekte.

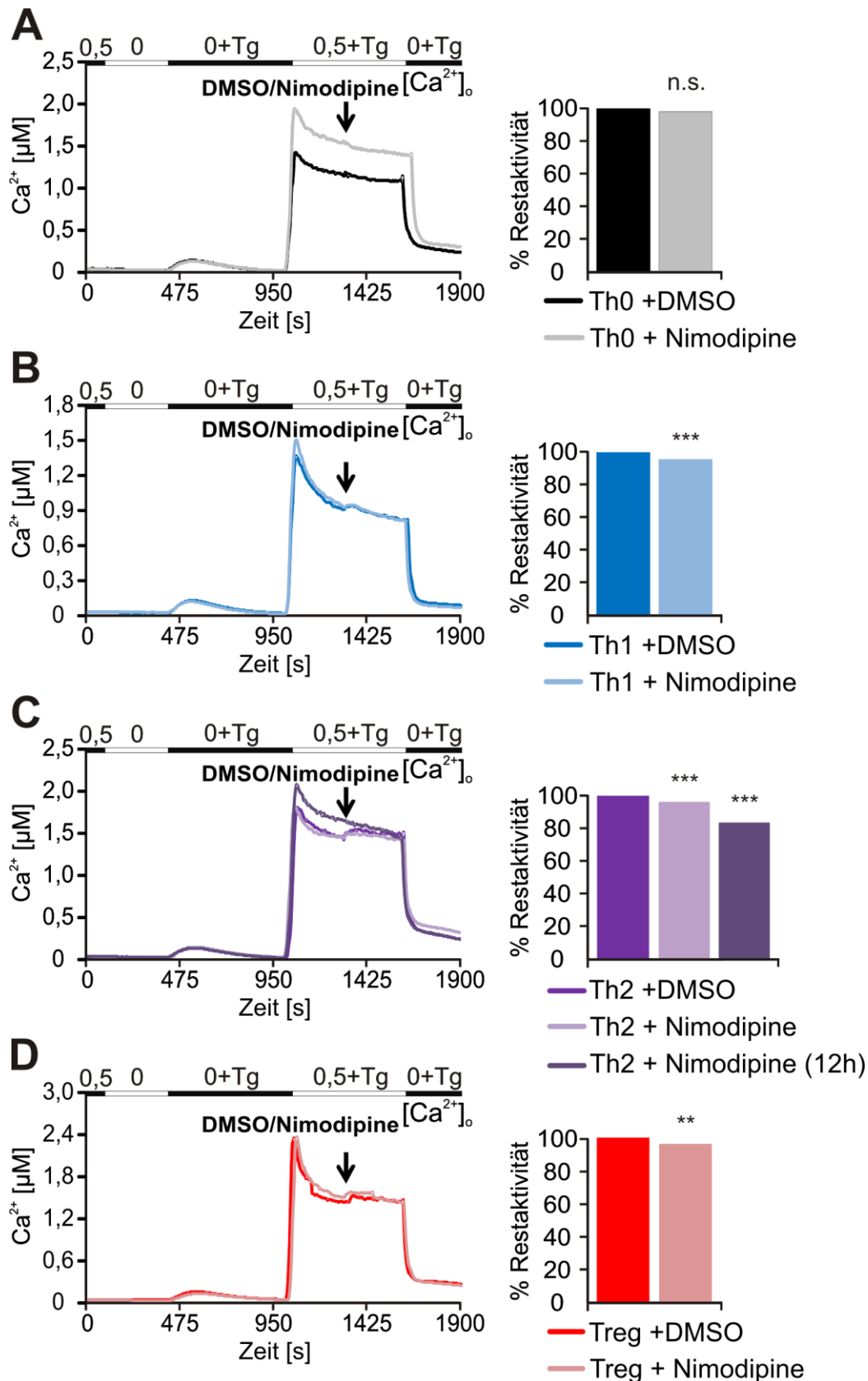


Abbildung 27: Einfluss von Nimodipine (L-Typ Ca_v -Blocker) auf die Plateauphase des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in CD4⁺ Subtypen: Kontrolle Th0 (A), Th1 (B), Th2 (C), Treg (D). Aktivierung SOCE erfolgte über Ca^{2+} -readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. 5 Minuten nach Beginn der Plateauphase wurde der L-Typ Ca_v Kanal Blocker Nimodipine (2 μM) in 0,5 mM CaCl_2 Lösung appliziert. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf

Kalziumkonzentrationen kalibriert. Die DMSO Kontrolle repräsentiert die dunkler gefärbten Linien- und Balkendiagramme, die mit Nimodipine behandelten Proben die heller gefärbten Linien- und Balkendiagramme in A-D. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Erniedrigung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Nimodipine Applikation (heller gefärbte Balken) verglichen mit den DMSO Kontrollen (dunkler gefärbte Balken) gemessen aus einem 1 Spender. $n(\text{Th0} + \text{DMSO}) = 219$, $n(\text{Th0} + \text{Nimodipine}) = 250$, $n(\text{Th1} + \text{DMSO}) = 229$, $n(\text{Th1} + \text{Nimodipine}) = 252$, $n(\text{Th2} + \text{DMSO}) = 231$, $n(\text{Th2} + \text{Nimodipine}) = 247$, $n(\text{Treg} + \text{DMSO}) = 252$, $n(\text{Treg} + \text{Nimodipine}) = 253$

6.2.6.3 Einfluss von L-Typ Ca_v Blockern auf SOCE in CD4^+ und Th2 Zellen

In Robert et al. (2014) führt die Inhibition des L-Typ Ca_v Kanals durch Nicardipine zu einer stark reduzierten Kalziumantwort in Th2 Zellen. Um zu untersuchen, ob andere Blocker einen stärkeren Effekt aufweisen, wurden zusätzlich zu Nimodipin die Blocker Nifedipine und Nicardipine in Hinblick auf ihre inhibitorische Wirkung auf SOCE untersucht. Hierfür wurden zum einen stimulierte CD4^+ Zellen, sowie *in-vitro* polarisierter Th2 Zellen verwendet. Während der Messung wurde SOCE unter Verwendung des Ca^{2+} -readdition Protokolls gemessen und der Blocker jeweils während der Plateauphase appliziert. Der in DMSO gelöste Blocker wurde in einer 0,5 mM CaCl_2 Lösung appliziert.

Nach Applikation der Blocker bzw. der DMSO Kontrolle (Abbildung 28A, B, C, D) war in allen Bedingungen eine kleine Erhöhung des Signals zu beobachten. Dabei handelte es sich um ein Spülartefakt. Nach Applikation von 10 μM Nicardipine war eine signifikante Reduktion des Plateaus auf 86 % und damit eine 14 %ige Inhibition zu beobachten. Die Applikation von Nifedipine (10 μM) hatte keinen Einfluss auf das Kalziumplateau. Nimodipine (2 μM) reduzierte das Kalziumplateau signifikant um 4,5 %.

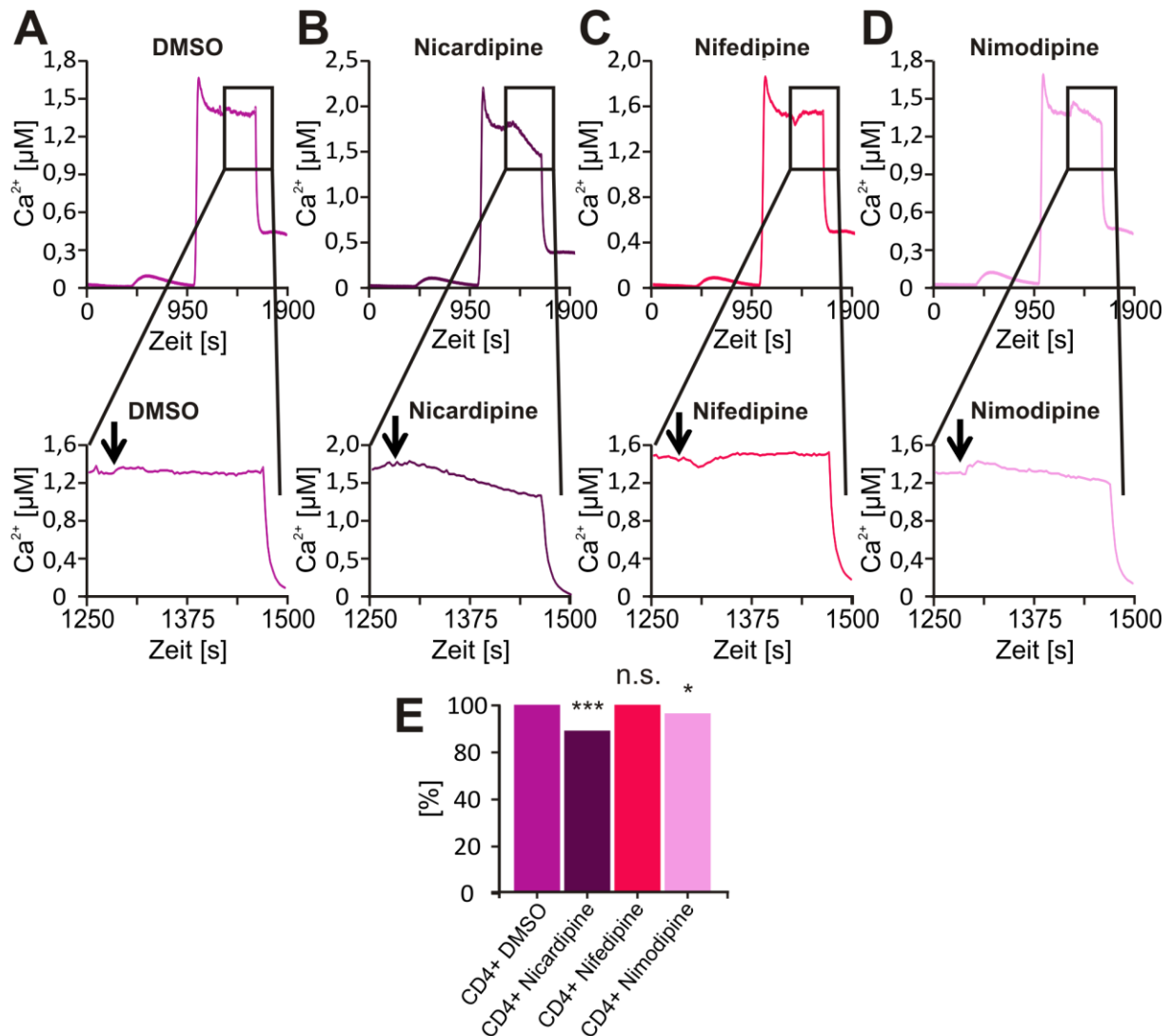


Abbildung 28: Einfluss von L-Typ Ca_v -Blockern auf die Plateauphase des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in stimulierten CD4^+ Zellen. Die Stimulation erfolgte über 7 Tage mit $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ Beads mit einer Ratio von 1:10. Aktivierung SOCE erfolgte über Ca^{2+} -readdition Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Die Applikation des Blockers erfolgte nach der Hälfte der Plateauphase (Zyklus 260). Der zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert. A-D: Mittlerer zeitlicher Verlauf der Kalziumkonzentrationen von CD4^+ Zellen bei Perfusion mit unterschiedlichen Blockern, insgesamt 1 Messtag. A: Applikation von DMSO (n = 187). B: Applikation Nicardipine (10 μM , n = 225). C: Applikation Nifedipine (10 μM , n = 251), D: Nimodipine (2 μM , n = 220). E: Quantifizierung der Restaktivität des SOCE Plateaus in CD4^+ nach Blocker/DMSO Applikation normiert auf die DMSO Kontrolle.

Da Nicardipine bereits einen kleinen Effekt auf die Gesamtpopulation der stimulierten CD4^+ zeigte, wurden die drei verwendeten Blocker zusätzlich auf das Plateau von *in vitro* polarisierten Th2 Zellen gegeben, um einen möglichen stärkeren Effekt auf die Subpopulation zu demaskieren.

Wie im vorherigen Abschnitt wurde 10 μM Nicardipine (Abbildung 29B), 10 μM Nifedipine (Abbildung 29C) oder 2 μM Nimodipine (Abbildung 29D) bzw. DMSO (Abbildung 29A) auf die Plateauphase appliziert und die Reduktion des Kalziumplateaus kalkuliert (Abbildung 29E).

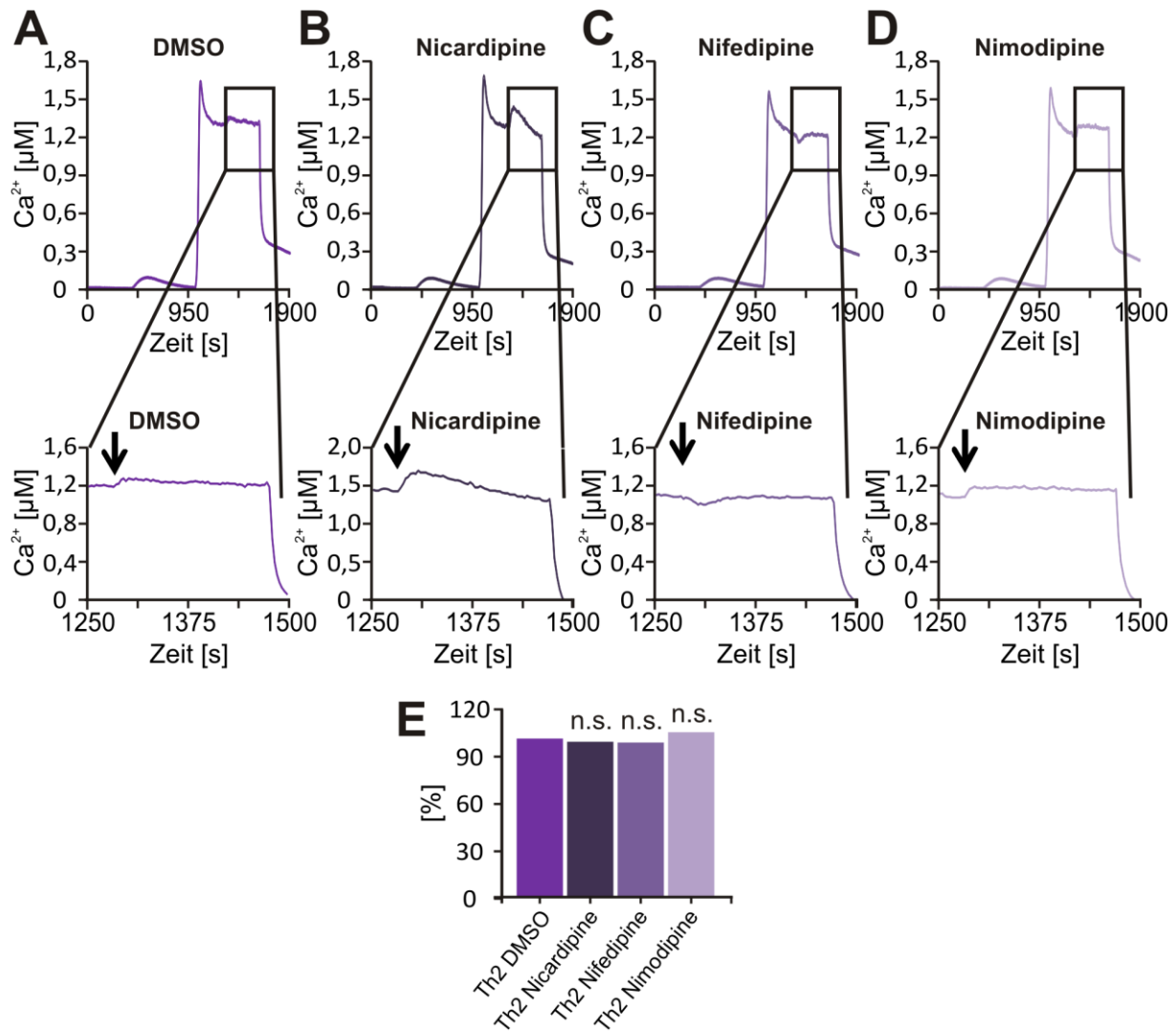


Abbildung 29: Einfluss von L-Typ Ca_v -Blockern auf die Plateauphase des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in Th2 Zellen. Aktivierung SOCE erfolgte über Ca^{2+} -readdition-Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Nach der Hälfte der Plateauphase (Zyklus 260) wurde der jeweilige Blocker in 0,5mM CaCl_2 appliziert. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert. A: Applikation von DMSO (n = 247). B: Applikation Nicardipine (10 μM , n = 223). C: Applikation Nifedipine (10 μM , n = 237), D: Nimodipine (2 μM , n = 247). E: Quantifizierung der Restaktivität Plateau SOCE in Th2 nach Blocker/DMSO Applikation normiert auf die DMSO Kontrolle.

Keiner der Blocker zeigte die in Robert et al. beschriebene (Robert et al. 2014) signifikante Reduktion des Kalziumplateaus in Th2 Zellen nach Applikation. Die im Ca^{2+} readdition Protokoll gemessenen Kalziumphänotypen ließen sich weder in Th2 Zellen, noch in den anderen Subtypen Th1 oder Treg auf von Nicardipine, Nifedipine oder Nimodipine modulierbaren spannungsabhängigen Kalziumkanälen zurückführen.

6.2.7 Charakterisierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach Aktivierung durch α CD3/ α CD28 Aktivator Bead Stimulation

In den vorherigen Kapiteln wurden die Kalziumsignale der CD4⁺ T-Zell Subtypen charakterisiert. In allen gemessenen Parametern Einflussrate, Kalziumpeak und Plateau ergaben sich grundlegende und signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen CD4⁺ T-Zell Subtypen. Die Bestimmung der Kalziumphänotypen erfolgte mit Hilfe des gängigen *Ca²⁺-readdition* Protokolls. In diesem wird die Aktivierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms über die Zugabe von Thapsigargin ausgelöst. Dieser artifizielle Stimulus beruht auf einer Inhibition der SERCA Pumpe (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) des Endoplasmatischen Retikulums und der damit einhergehenden passiven Entleerung der ER-Speicher. Dieser Vorgang aktiviert STIM und damit Orai ohne vorausgehende Aktivierung des T-Zell Rezeptors. Mit dem *Ca²⁺-readdition* Protokoll wird somit nicht die vollständige Signalkaskade aktiviert. Ein physiologischerer Stimulus für den speichergesteuerten Kalziumeinstrom ist die Aktivierung der Zellen über α CD3/ α CD28 gekoppelte Beads. Durch die CD3/CD28 Ko-Stimulation wird die physiologische Aktivierung des T-Zell Rezeptors über antigenpräsentierende Zellen imitiert. Dies resultiert in der Aktivierung von SOCE über die Phospholipase C - IP₃ - IP₃-Rezeptor Signalkaskade.

6.2.7.1 Messung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach Aktivierung durch α CD3/ α CD28 Aktivator Bead Stimulation

Um die Änderung des zytosolischen Kalziums in den CD4⁺ T-Zell Subtypen über die Aktivierung des T-Zell Rezeptors als Antwort auf Bildung einer artifiziellen immunologischen Synapse zu messen, wurden α CD3/ α CD28 Aktivator Beads in die Messkammer appliziert. Für die Auswertung wurden nur Zellen hinzugezogen, die einen sichtbaren Kontakt zu einem α CD3/ α CD28 Aktivator Bead zeigten.

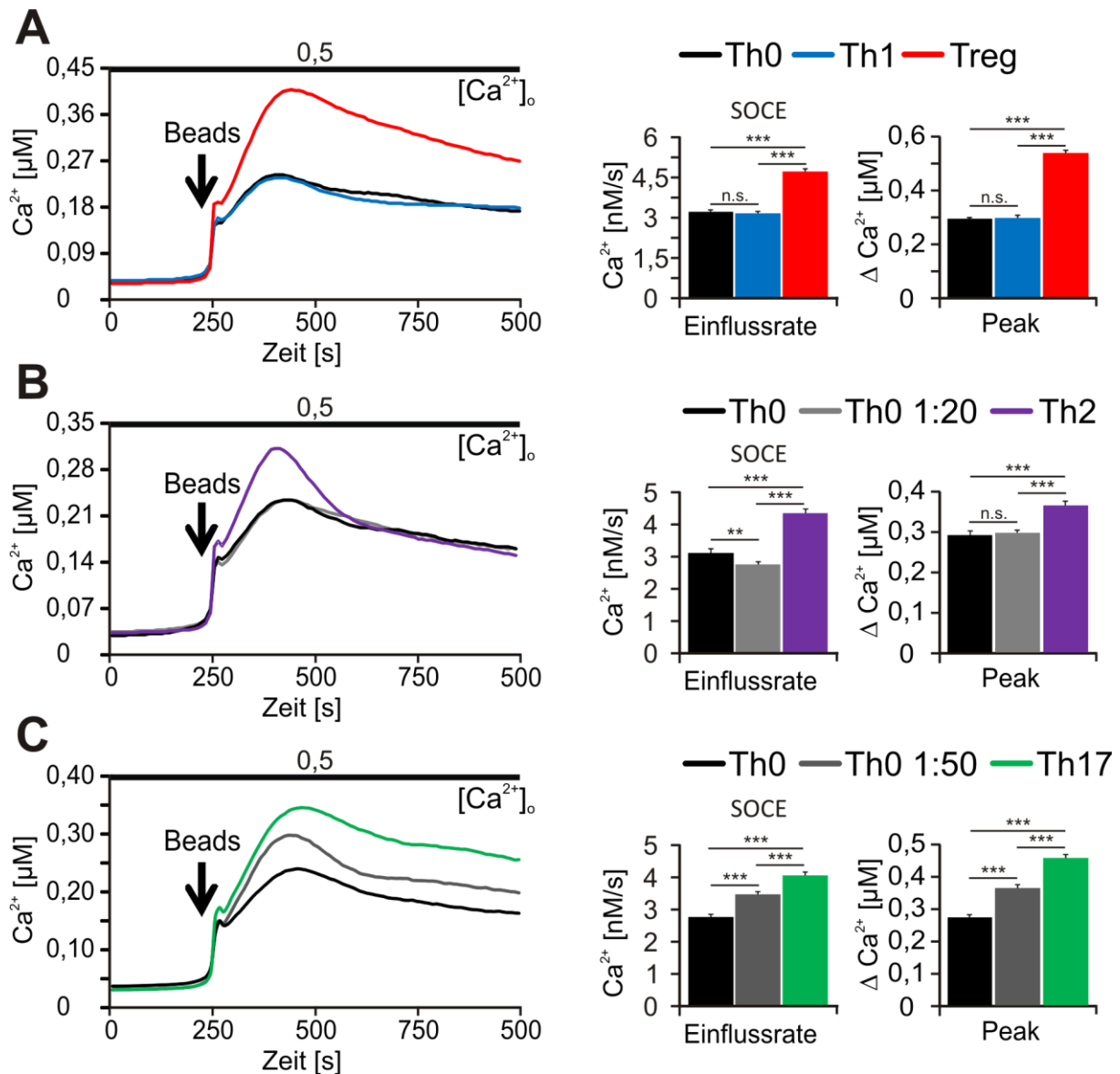


Abbildung 30: Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Aktivierung mit α CD3/ α CD28 Aktivator Beads. Die Polarisierung der CD4⁺ Zellen in T-Zell Subtypen erfolgte durch Polarisierungsbedingung VI (Tabelle 6, Donor 39-88). Die Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura 2 AM basierendem Ca²⁺-Imaging an Tag 7 nach Polarisierungsbeginn. Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert (Liniendiagramm, A-C): A: Th0 (n = 734), Th1 (n = 717), Treg (n = 1071); B: Th0 (n = 477), Th0 1:20 (n = 728), Th2 (n = 557); C: Th0 (n = 480), Th0 1:50 (n = 440), Th17 (n = 636). Daraus wurde die mittlere die Einflussrate und der Kalziumpeak quantifiziert (Balkendiagramme A-C). Die Messung wurde in 0,5 mM CaCl₂ Lösung durchgeführt.

Wie auch bei der Speicherentleerung durch Thapsigargin zeigten Treg die signifikant größte Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration (Abbildung 30A). Die quantifizierten Parameter Ca²⁺-Rate und -Peak waren signifikant größer als in allen anderen Subtypen und in der Kontrolle Th0. Somit konnte hier der zuvor beobachtete Phänotyp bestätigt werden.

Th1 zeigten bei der rezeptorvermittelten Aktivierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms keinen signifikanten Unterschied im Kalziumsignal zu Th0 (Abbildung

30A). In der Thapsigargin-vermittelten Aktivierung war der Kalziumeinstrom in Th1 kleiner als in Th0 Zellen (Abbildung 17).

Ebenso war der Kalziumphänotyp von Th2 Zellen nach Aktivierung durch den physiologischeren Stimulus im Vergleich zum artifiziellen Stimulus Thapsigargin verändert. Nach einer Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin waren die Kalziumsignale kleiner als bei Treg, Th1 und Kontrollzellen Th0 (Abbildung 17). Die rezeptorvermittelte Stimulation bewirkte eine signifikant vergrößerte Einflussrate, sowie einen signifikant größeren Kalziumpeak verglichen mit Th0 und Th1 (Abbildung 30).

Auch in Th17 Zellen ließen sich Unterschiede zur Thapsigargin-vermittelten Aktivierung feststellen (Abbildung 17). Nach artifiziellm Stimulus zeigten Th17 ein signifikant kleineres Kalziumsignal als Th0 Zellen, insgesamt das Kleinste von allen gemessenen Subtypen. Nach rezeptorvermittelter Aktivierung war die Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration signifikant höher als in Th0 Zellen und ähnlich groß verglichen mit Treg. Damit zeigten Th17 nach α CD3/ α CD28 Bead Aktivierung das zweitgrößte Kalziumsignal aller gemessenen Subtypen (Abbildung 30C). Übereinstimmend mit der Thapsigargin-vermittelten Aktivierung wiesen die Bead Kontrollen Th0 1:20 und Th0 1:50 einen intermediären Kalziumphänotyp zwischen Th0 und Th2 bzw. Th17 auf (Abbildung 30). Zusammenfassend konnten auch nach rezeptorvermittelter Aktivierung des Kalziumeinstroms charakteristische Kalziumphänotypen der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ Subtypen festgestellt werden. Diese zeigten jedoch nicht nur abweichende Unterschiede in ihren absoluten Kalziumwerten (Rate, Peak und Plateau), sondern veränderten sich auch bezüglich ihrer relativen Kalziumphänotypen, nicht nur in Bezug auf die dazugehörige Kontrolle, sondern auch in Bezug auf die anderen Subtypen. Bei beiden Stimulationsarten wiesen Treg die größte Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration auf, die zweithöchste Änderung war nach Bead Stimulation in Th17 zu messen, gefolgt von Th2. Alle drei Subtypen zeigten einen höheren Kalziumeinstrom nach Aktivierung als die Kontrollzellen Th0. In Th1 war keine Änderung des zytosolischen Kalziums vergleichbar mit Th0 zu beobachten.

6.2.7.2 Einfluss von L-Typ Ca_v Blockern auf speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach Aktivierung durch α CD3/ α CD28 Aktivator Bead Stimulation

In Robert et al. (2014) wurde gezeigt, dass Nicardipine die Kalziumantwort nach T-Zell Rezeptor Aktivierung in Th2 selektiv erniedrigt. Dieser Effekt konnte nach Messung der Subtypen mittels Thapsigargin Aktivierung im Ca^{2+} -*Readdition* Protokoll nicht bestätigt werden (Abbildung 29). Da es sich hierbei um einen artifiziellen Stimulus handelte, sollte nun

in den getestet werden, ob der inhibitorische Effekt von Nicardipine auf die T-Zell Rezeptor vermittelte Kalziumantwort in Th2 nach physiologischerer Stimulation über α CD3/ α CD28 Aktivator Beads reproduzierbar ist.

Nach akuter Behandlung mit Nicardipine (10 μ M) konnte in Th0 auch durch den physiologischeren Stimulus mit α CD3/ α CD28 Aktivator Beads kein Unterschied im Kalziumeinstrom nach Aktivierung festgestellt werden (Abbildung 31A). Die Effekte auf das Kalziumsignal in Th1 und Treg durch T-Zell Rezeptor Aktivierung nach Inhibition der L-Typ Ca_v Kanäle mit Nicardipine war gering, jedoch signifikant (Abbildung 31B, C). Im mittleren zeitlichen Verlauf der Kalziumkonzentration war die Inhibition kaum sichtbar. Nach der Quantifizierung zeigte sich eine Reduktion der Kalziumkonzentration von 296 nM auf 270 nM im Kalziumpeak, was einer Reduktion von 9 % entspricht. In Treg verringerte sich der mittlere Peak von 532 nM Kalzium auf 454 nM und damit um 15 %. In Th2 und Th17 konnte der Kalziumpeak der TCR-vermittelten Kalziumantwort durch Nicardipine Behandlung im Mittelwert um 3 % bzw 5 % verringert werden (Abbildung 31D, E). Die in Th2 und Th17 beobachteten Tendenzen waren nicht signifikant. Damit konnten auch während einer Aktivierung der Zellen durch Imitation einer immunologischen Synapse mittels α CD3/ α CD28 Aktivator Beads nur kleine Unterschiede in den CD4^+ Subpopulationen nach Nicardipine Behandlung festgestellt werden.

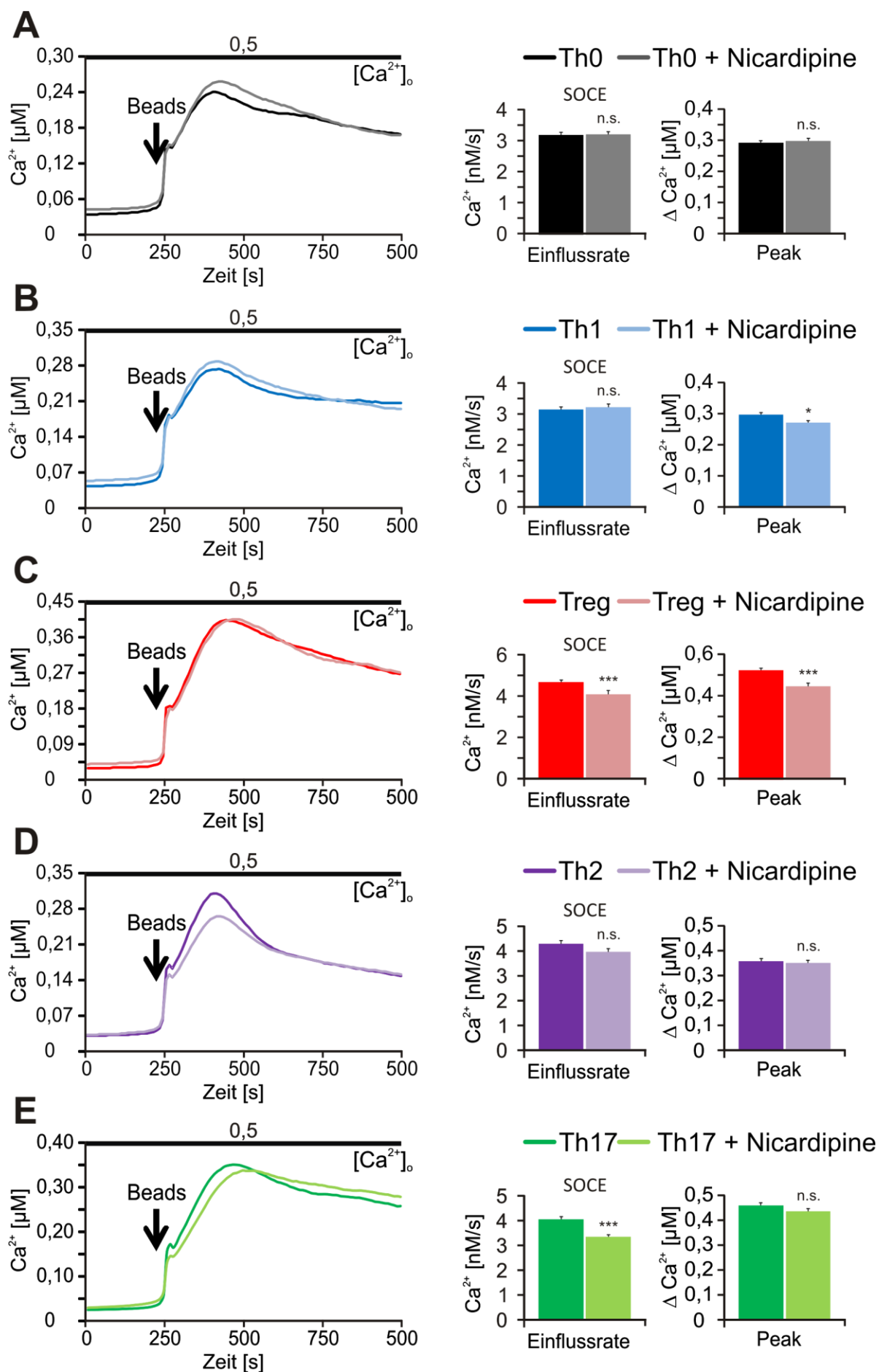


Abbildung 31: Einfluss des L-Typ Ca_v -Blocker Nicardipine auf die Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in CD4^+ T-Zell Subtypen nach Aktivierung mittels $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ Aktivator Beads. Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels Fura 2 AM basiertem Ca^{2+} -Imaging an Tag 7 nach Polarisierungsbeginn. Aktivierung des Kalziumeinstroms durch $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ Aktivator Beads in Anwesenheit von/ohne 10 μM Nicardipine: Die Messungen wurde in 0,5 mM CaCl_2 Lösung durchgeführt. Mittlerer zeitlicher Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen der unterschiedlichen Subtypen kalibriert (Liniendiagramme). Quantifizierung der mittleren Einflusssrate und der Kalziumpeaks (Balkendiagramme). Die DMSO Kontrolle repräsentiert die dunkler gefärbten Linien- und Balkendiagramme, die mit Nicardipine behandelten Proben die heller gefärbten Linien- und Balkendiagramme in A-E. A: n (Th0) = 734, n (Th0 + Nicardipine) = 644; B: n (Th1) = 717, n (Th1+ Nicardipine) = 403; C: n (Treg) = 1071, n (Treg+Nicardipine) = 342; D: n (Th2) = 557, n (Th2+Nicardipine) = 639; E: n (Th17) = 636, n (Th17+Nicardipine) = 639; 1 Messtag.

6.2.8 Untersuchung der Sensitivität des speichergesteuerten Kalziumeinstroms der CD4^+ T-Zell Subtypen gegenüber Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)

In Bogeski et al. (2010) wurde gezeigt, dass der speichergesteuerte Kalziumeinstrom durch reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) inhibiert ist. Effektor T-Zellen, die im entzündlichen Milieu hohem oxidativem Stress ausgesetzt sind, werden durch die Hochregulation von Orai3 weniger sensitiv gegenüber dieser Inhibition. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zur weiteren Charakterisierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms der *in-vitro* polarisierten T-Zell Subtypen der Umfang der Inhibition durch ROS in den unterschiedlichen Subtypen untersucht.

Das Ca^{2+} -*readdition* Protokoll wurde hierfür in Anwesenheit von 1 μM H_2O_2 durchgeführt um das oxidative Milieu nachzuahmen. Die beiden CD4^+ T-Zell Subtypen Th1 und Treg, sowie die Kontrolle Th0, zeigten eine signifikante Inhibition des speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach H_2O_2 Behandlung. Die Unterschiede in Th0 und Treg waren signifikant für alle quantifizierten Parameter Thapsigarginpeak, Einflusssrate, Kalziumpeak und Plateau. In Th1 waren nur Einflusssrate und Plateau signifikant erniedrigt. Tabelle 16 zeigt die Inhibition der berechneten Kalziumparameter durch ROS in Prozent. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Speicherentleerung durch Thapsigargin (Tg Peak) war in den Subtypen unterschiedlich stark durch die Anwesenheit von H_2O_2 beeinflusst. Th0 zeigte eine Reduktion um 17 %, während in Treg ein signifikanter Anstieg um 8 % zu erkennen war. Der Thapsigargin Peak in Th1 war durch die Anwesenheit von H_2O_2 nicht beeinflusst. Die Einflusssrate in Th0, Th1 und Treg war durch H_2O_2 ähnlich stark reduziert. Der Kalziumpeak von Th0 zeigte eine stärkere Sensitivität auf ROS (33 %) als Treg (19 %). Der Unterschied im Kalziumpeak nach H_2O_2 Behandlung zeigte in Th1 ähnliche Tendenzen wie Th0 Zellen, diese waren jedoch nicht signifikant. Das Kalziumplateau in Th0 war um 36 % inhibiert, in Treg um 25 % und in Th1 um 29 %. Im Plateau zeigten alle CD4^+ Subtypen signifikante und ähnliche Unterschiede. Zusammengefasst zeigten Th1 und Treg kaum Unterschiede bezüglich der Sensitivität auf die Inhibition von SOCE durch reaktive

Sauerstoffspezies. Keiner der Subtypen zeigte eine stark abweichende Reaktion auf die Zugabe von H_2O_2 im Vergleich zu den anderen Subpopulationen.

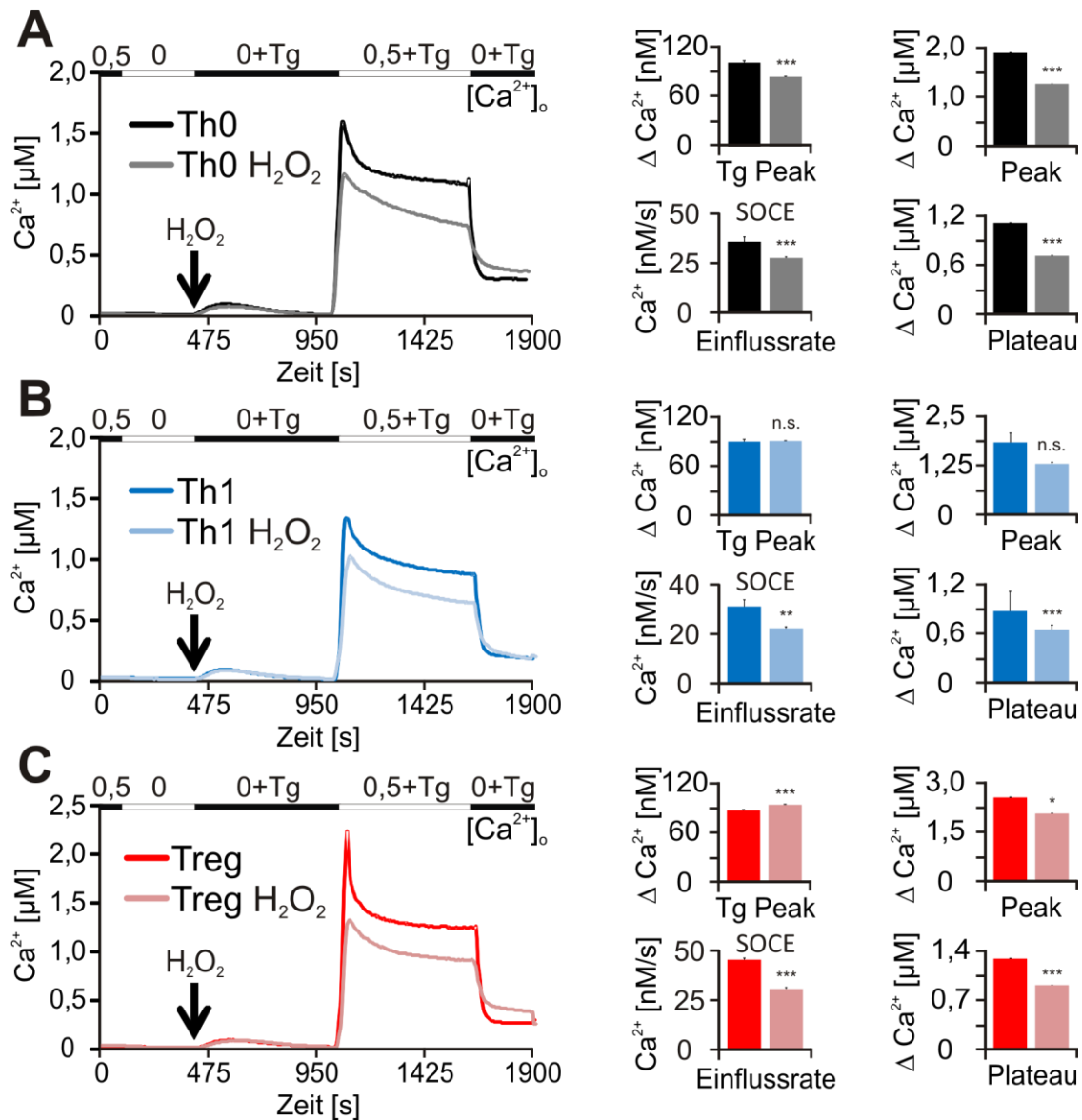


Abbildung 32: Sensitivität der CD4^+ T-Zell Subtypen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gemessen anhand der Inhibition. Aktivierung SOCE erfolgte über Ca^{2+} -readdition Protokoll durch Applikation von Thapsigargin. Perfusionen ab 0 mM Kalzium und Thapsigargin (0 Ca^{2+} + TG) in Anwesenheit von H_2O_2 . A, C, E: Der mittlere zeitliche Verlauf der Ratio (F340/F380) wurde auf Kalziumkonzentrationen kalibriert. A: zeitlicher Verlauf und Quantifizierung Thapsigarginpeak, Einflussrate, Kalziumpeak und Plateau in Th0 mit/ohne H_2O_2 (1mM; n (Th0) = 1125, n (+ H_2O_2) = 1217). B: zeitlicher Verlauf und Quantifizierung Thapsigarginpeak, Einflussrate, Kalziumpeak und Plateau in Th1 ohne/mit H_2O_2 (1mM; n (Th1) = 1413, n (+ H_2O_2) = 1426) C: zeitlicher Verlauf und Quantifizierung Thapsigarginpeak, Einflussrate, Kalziumpeak und Plateau in Treg ohne/mit H_2O_2 (1mM; n (Treg) = 1442, n (+ H_2O_2) = 1483).

Tabelle 16: Reduktion der Kalzium Parameter nach H₂O₂-Behandlung in Th0, Th1 und Treg

Reduktion nach H ₂ O ₂ in %	Th0	Th1	Treg
Δ Tg	16.9	-0.7	-8.1
Einflussrate	23.0	27.7	32.5
Δ Peak	33.4	30.0	19.3
ΔPlateau	35.9	25.3	29.2

6.3 Apoptose in CD4⁺ T-Zell Subtypen und die Rolle von IL-21

Autoreaktive T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Autoimmunität und sind ein essentieller Faktor für die Progression von Autoimmunerkrankungen. Im gesunden Immunsystem gibt es verschiedene Mechanismen autoreaktive T-Zellen zu beseitigen, einer davon ist der programmierte Zelltod (Apoptose). Ist dieser Mechanismus defekt, kann sich die Balance zwischen Immunität und Immuntoleranz in die pathologische Richtung einer Autoimmunreaktion verschieben (Comi et al. 2012).

Diese Arbeit war der erste Teil eines Projektes, das die Kalziumsignale von T-Zellen in Multiple Sklerose Patienten untersuchen soll. Es wird vermutet, dass Th17 Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielen (Sie et al. 2014; Volpe et al. 2015; Dos Passos et al. 2016). Diese sind einer der Hauptproduzenten von IL-21 *in-vivo* (Nurieva et al. 2007; Spolski & Leonard 2014). Zudem wird IL-21 ebenfalls in den Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen gebracht (Spolski & Leonard 2014).

Als Voruntersuchung für dieses Projekt sollten deshalb die *in-vitro* Effekte dieses Zytokins auf Polarisierung und Apoptose der CD4⁺ T-Zell Subtypen genauer betrachtet werden.

Hierfür wurde die Apoptosesensitivität der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen im Zusammenhang mit IL-21 untersucht. Es wurde beleuchtet, ob sich die *in-vitro* polarisierten Subtypen in ihren endogenen IL-21 Konzentrationen unterscheiden und ob eine zusätzliche Zugabe von IL-21 die Sensitivität der Subtypen gegenüber Apoptose verändern kann.

6.3.1 Differenzielle Expression von IL-21 in CD4⁺ T-Zell Subtypen

Zunächst wurde mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht (Abbildung 33A), ob die CD4⁺ Subtypen IL-21 in unterschiedlicher Menge exprimieren. Zusätzlich konnte die Menge an IL-21 produzierenden Zellen mit Hilfe von intrazellulären Färbungen durchflusszytometrisch bestimmt werden (Abbildung 33B). Dabei fiel auf, dass die CD4⁺ Subtypen sehr unterschiedliche IL-21 Level aufwiesen. Th17 zeigten die höchsten IL-21 relativen mRNA Mengen verglichen mit den anderen Subtypen. Treg exprimierten ähnliche Mengen IL-21 mRNA wie Th1. In Th2 sind die IL-21 mRNA Level verglichen mit den anderen

Subtypen am niedrigsten. In der durchflusszytometrischen Messung produzierten 24 % der Th17 Zellen IL-21, im Vergleich zu 15 % der Treg, gefolgt von Th2 Zellen mit 4 %. Th1 zeigten die größte Population IL-21 produzierender Zellen (72 %).

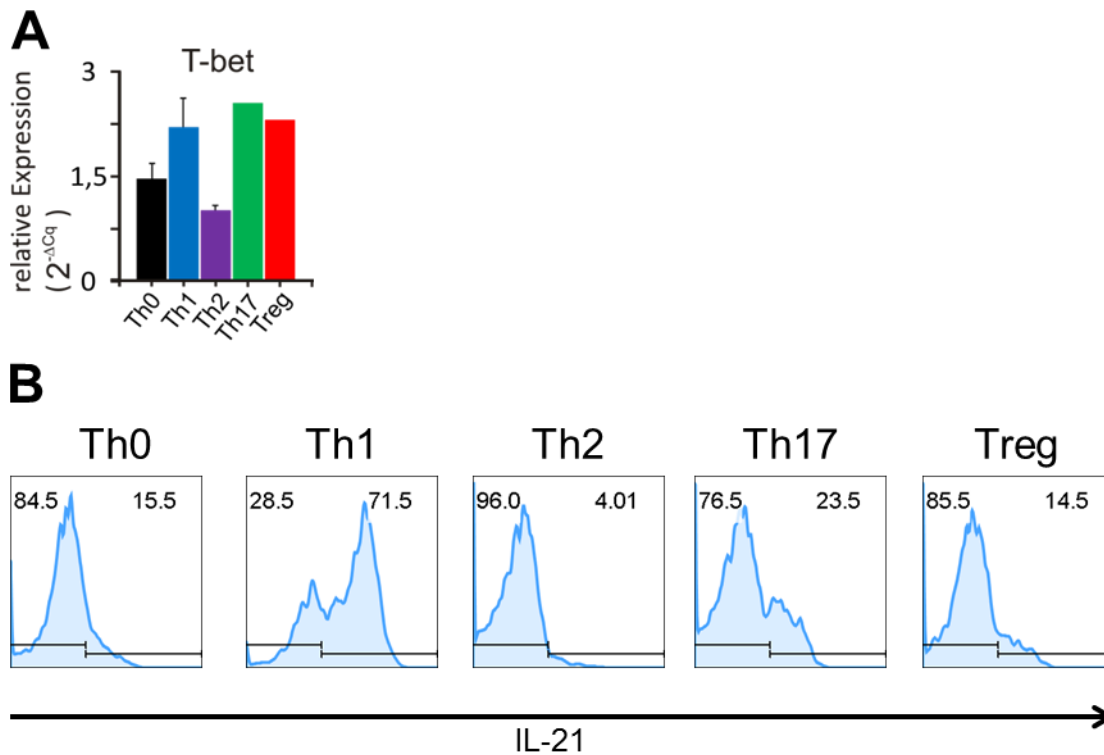


Abbildung 33: Expression von IL-21 in CD4⁺ T-Zell Subtypen. A: Bestimmung der IL-21 mRNA Levels mittels quantitativer Real-time PCR. Normierung auf das Haushaltsgen RNA Polymerase. (n (Th0, Th1, Treg) = 2, n (Th2, Th17) = 1) B: Bestimmung der IL-21 produzierenden Zellpopulationen in CD4⁺ T-Zellsubtypen mittel Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden 7 Tage nach Beginn der Polarisierung geerntet, fixiert permeabilisiert und mittels Antikörper gegen IL-21 durchflusszytometrisch detektiert. Für die graphische Darstellung wurde der Median der mittleren Fluoreszenz Intensität quantifiziert (n = 2). B: Bestimmung der IL-21 mRNA Levels mittels quantitativer Real-time PCR, normiert auf das Haushaltgen TBP.

6.3.2 Einfluss von IL-21 auf die Signaturzytokin Expression

Als nächstes wurde untersucht, ob IL-21 die Produktion der Signaturzytokine und damit die Polarisierung der CD4⁺ Zellen in unterschiedliche Subtypen beeinflussen kann. Die Subtypen wurden 12 Stunden vor der Messung mit 100 ng/ml IL-21 inkubiert, um die IL-21 Produktion anderer Zellen und die daraus resultierende *in-vivo* Zirkulation des Zytokins nachzuahmen. Die durchflusszytometrische Messung zeigte, dass die Menge an Signaturzytokinen nach der IL-21 Behandlung nicht verändert zu sein scheint.

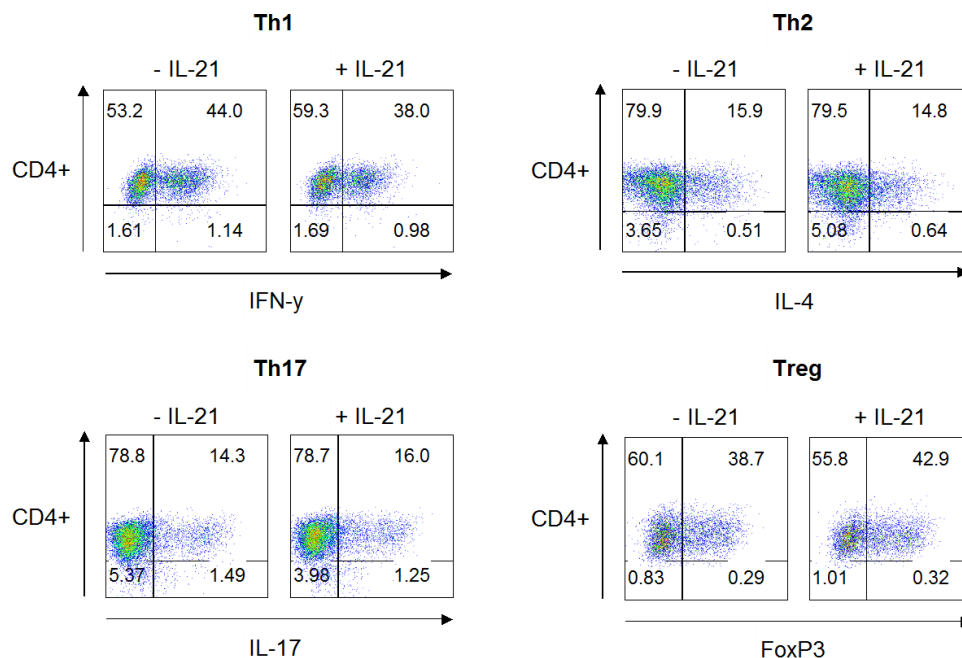


Abbildung 34: Signaturzytokin/Transkriptionsfaktor Produktion in Th1, Th2, Th17 und Treg mit und ohne IL-21 Behandlung (12 h vor Ernte, 100 ng/ml). Die Zellen wurden 7 Tage nach Beginn der Polarisierung geerntet, fixiert, permeabilisiert und mittels Antikörper gegen die jeweiligen Signaturzytokine bzw. Transkriptionsfaktor IFN- γ , IL-4, IL-17, FoxP3 durchflusszytometrisch detektiert (n = 1).

6.3.3 Die Rolle von IL-21 in spontaner und induzierter Apoptose von CD4⁺ T-Zell Subtypen

Die Rolle von IL-21 in der Sensitivität der CD4⁺ T-Zell Subtypen gegenüber Apoptose wurde mittels zwei verschiedener Methoden bestimmt. Annexin V Färbungen, ein gängiger Apoptosemarker, wurde verwendet, um die Gesamtpopulation apoptotischer Zellen zu quantifizieren. Bei dieser Endpunkt Messung wurde sowohl spontane, als auch mit Staurosporin induzierte Apoptose gemessen. Durch die transiente Expression des Caspase-3 Reporters pCasper3-GR in den T-Zell Subtypen konnte außerdem die Kinetik der Caspase-3 vermittelten Apoptose aufgezeichnet werden.

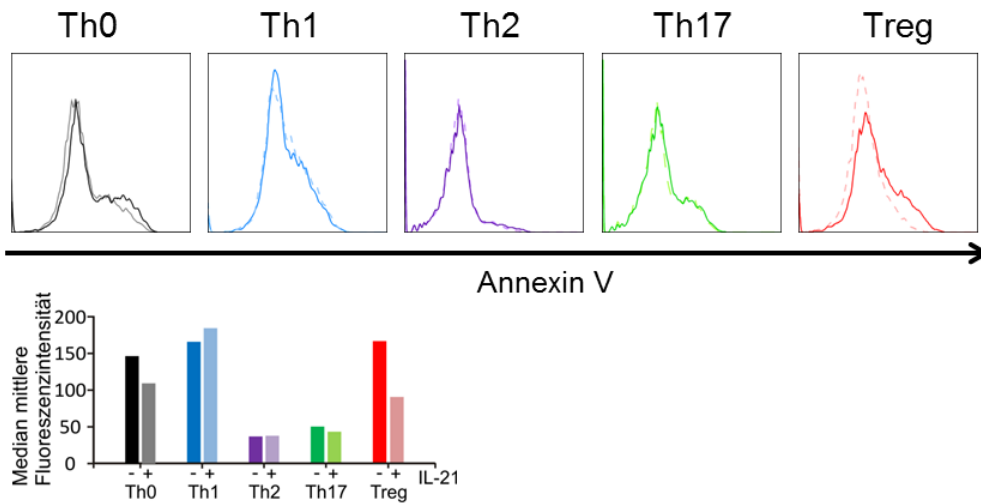
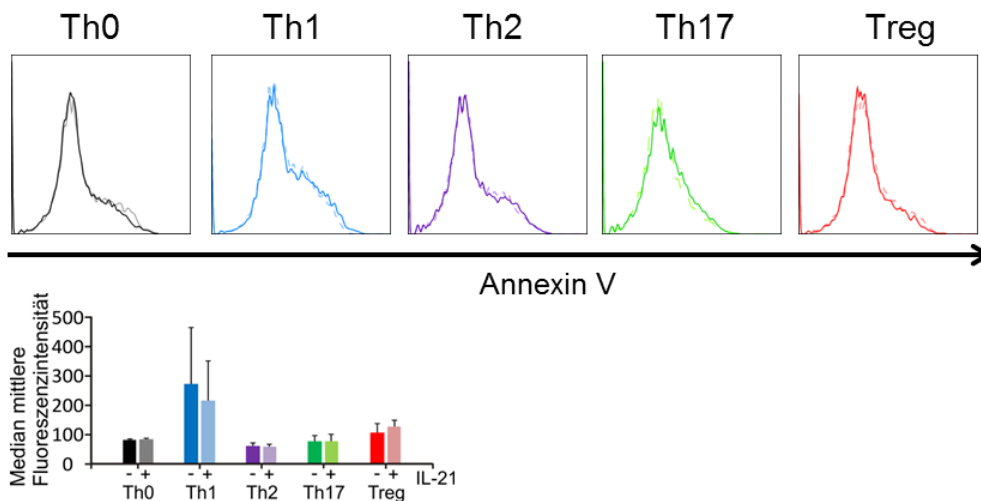
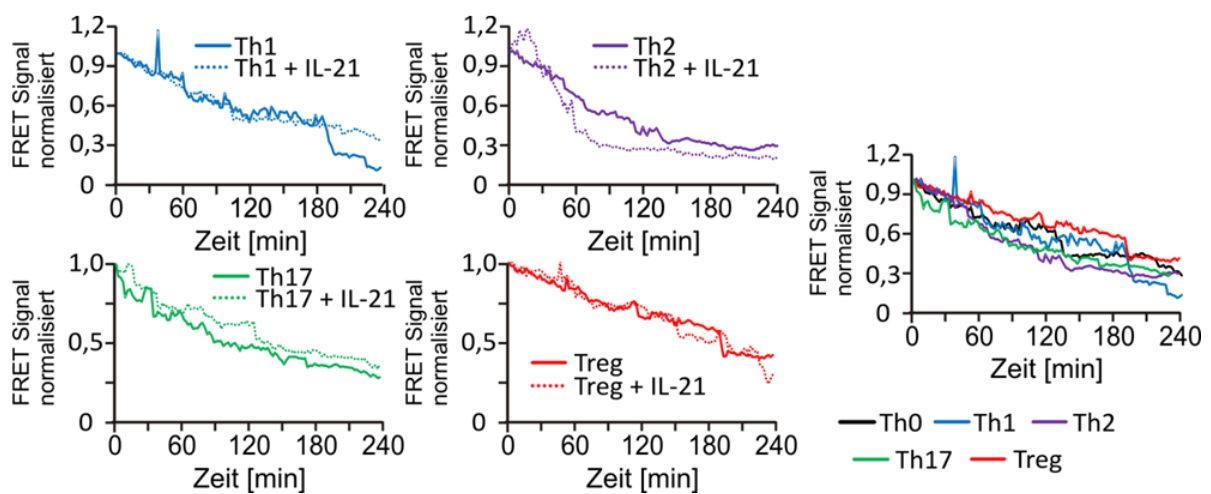
A Spontane Apoptose**B Induzierte Apoptose****C Caspase-3 abhängige Apoptose**

Abbildung 35: Keine Beeinflussung der Sensitivität von spontaner oder induzierter Apoptose von CD4⁺ T-Zellsubtypen nach IL-21 Behandlung. A, B: Annexin V Färbung zur Quantifizierung apoptotischer Zellen nach spontaner Apoptose (A, n=1)/mit Staurosporin induzierter Apoptose (B; 1 μ M, 4h; n=4). Für die graphische Darstellung (Balkendiagramm) wurde der Median der mittleren Fluoreszenz Intensität quantifiziert. C: Messung des FRET-Signals (4h) transient pCasper3-GR exprimierender CD4⁺ T-Zell Subtypen (mit/ohne IL-21 Behandlung; 12h, 100 ng/ml) nach Induktion der Apoptose mit 1 μ M Staurosporin. Das abnehmende FRET Signal korreliert mit der Caspase-3 Aktivität. Die Messung wurde bei 37°C mit 5 % CO₂ in AIM-V Medium durchgeführt (n=3).

Zuerst wurde die spontane Apoptose, ohne Induktion mittels eines apoptotischen Stimulus gemessen (Abbildung 35A). Ein Vergleich mit der Kontrolle zeigte einen Unterschied in der Menge apoptotischer Zellen in den unbehandelten Subtypen. Th1, Treg und Th0 Zellen zeigten in der Quantifizierung des Medians der mittleren Fluoreszenz Intensität mehr Annexin V markierte Zellen als Th2 und Th17. Jedoch wurde die Anzahl an apoptotischer Zellen durch die Behandlung mit IL-21 nicht beeinflusst. Auch in der durch Staurosporin induzierten Apoptose bewirkte die IL-21 Zugabe keine Änderungen in der Sensitivität gegenüber dem apoptotischen Stimulus. Die Analyse der Annexin V Färbung (Abbildung 35B) ergab nach Quantifizierung des Medians der mittleren Fluoreszenzintensität gleich viele Annexin V markierte Zellen des jeweiligen Subtyps mit sowie ohne Behandlung. Wie aus Abbildung 35C hervorgeht, unterschieden sich die Zellen ebenso wenig in der Caspase-3 abhängigen Apoptose. Die Kinetik des FRET Signals in den Kontrollzellen entsprach der Kinetik der IL-21 behandelten Zellen. Somit scheint die IL-21 Behandlung keinen Einfluss auf die Caspase-3 anhängige Apoptose zu haben (Abbildung 35C). Zusammengefasst konnte eine Behandlung mit IL-21 die CD4⁺ T-Zell Subtypen weder vor Apoptose schützen, noch die Apoptose verstärken. Jedoch schienen die CD4⁺ T-Zell Subtypen unterschiedlich stark auf den apoptotischen Stimulus zu reagieren. Gemessen an der Gesamtzahl an apoptotischen Zellen (Abbildung 35B) waren Th1 am sensitivsten, gefolgt von Treg. Th17 und Th2 waren am resistentesten gegenüber dem apoptotischen Stimulus Staurosporin.

7 Diskussion

7.1 Etablierung und Optimierung der *in-vitro* Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zell Subtypen

Naive CD4⁺ Zellen emigrieren nach ihrer Reifung aus dem Thymus in die peripheren sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten) und pendeln ab diesem Zeitpunkt zwischen Blut und lymphatischen Organen. Dort differenzieren sie durch Aktivierung über antigenpräsentierende Zellen in verschiedene Subtypen von Effektor T-Zellen (Murphy et al. 2009). Obwohl die unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellsubtypen teilweise ähnliche Zytokine und Transkriptionsfaktoren produzieren, erfolgt die Einteilung der Subtypen anhand eines charakteristischen Zytokins, welches hauptsächlich von einem definierten Subtyp hergestellt wird. Als biochemischer Botenstoff reguliert dieses charakteristische Zytokin viele physiologische Funktionen des CD4⁺ T-Zell Subtyps und wird deshalb Signaturzytokin genannt. Th1 werden über die Produktion von IFN- γ definiert, Th2 über die Produktion von IL-4 (Mosmann & Coffman 1987; Bottomly 1988). IL-17 produzierende Zellen werden als Th17 definiert (Harrington et al. 2005; Park et al. 2005). Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist spezifisch für regulatorische T-Zellen (Brunkow et al. 2001). Auch induzierbare regulatorische T-Zellen (iTreg) aus naive CD4⁺CD25⁻ Zellen produzieren den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Chen et al. 2003; Fu et al. 2004). Zu welchem Subtyp sich die CD4⁺ Zellen entwickeln ist abhängig von Zytokinmilieu und Stimulus (Zhu et al. 2010). Da die Ausbeute der CD4⁺ Subtypen nach direkter Isolation aus dem Blut je nach Subtyp sehr gering ist, wurden die Zellen *in-vitro* zu CD4⁺ Subtypen polarisiert. Zu Beginn dieser Arbeit lag in der Literatur kein optimales Protokoll zu Polarisierung humaner Subtypen vor. So wurde auf der Basis vorliegender Protokollen zur Polarisierung muriner CD4⁺ T-Zell Subtypen (Zhou et al. 2011; Fitch et al. 2006; Jäger et al. 2009) und den Protokollen zur Polarisierung von humanen Treg und Th17 (Liu et al. 2013; Manel et al. 2008) ein Polarisierungsprotokoll erstellt, das im Laufe der Arbeit fortwährend optimiert wurde.

Die Polarisierung von Th1 und Treg war bereits mittels der Polarisierungsbedingung II (Tabelle 8) erfolgreich. Es ist bereits bekannt, dass vor allem IL-12 essentiell für die Th1 Differenzierung ist. IL-12 wird *in-vivo* hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert (Akdis et al. 2011) und induziert die Produktion von IFN- γ über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT4. STAT4 reguliert die Th1 Differenzierung von CD4⁺ Zellen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, da er INF- γ und T-bet aktiviert und parallel IL-4 und GATA3 inhibiert (Zhu et al.

2010). Eine langanhaltende Aktivierung von STAT4 wird nur durch IL-12 hervorgerufen, nicht aber durch die Interferone, die nur eine transiente Aktivierung bewirken. Es ist gezeigt, dass eine optimale Differenzierung von Th1 Zellen eine Kombination von IL-12 mit IL-2 benötigt. Letzteres verstärkt den aktivierenden Einfluss von IL-12 auf den STAT4 Signalweg (Athie-Morales et al. 2004). Durch die Gabe von IL-2, IL-12, IFN- γ und dem neutralisierenden Antikörper α -IL4 konnte ab Tag 4 eine spezifische IFN- γ Produktion zwischen 40 % und 45 % erreicht werden (Abbildung 5). Ab Tag 4 sank die Produktion unspezifischer Zytokine während die Menge an IFN- γ produzierenden Zellen anstieg. Auch für Treg konnte nach der Erhöhung von α -IFN- γ eine spezifische Produktion von FoxP3 erreicht werden (Abbildung 8). Im Vergleich zu Polarisierungsbedingung I (Abbildung 4) stieg nicht nur die Menge an FoxP3-produzierenden Zellen, sondern parallel sank auch die Produktion von IFN- γ . Abbildung 6 zeigt, dass durch die Optimierung der Polarisierungsmedien (Tabelle 9) trotz suboptimaler Signaturzytokinproduktion in Th2 und Th17 die Menge an IFN- γ und Foxp3 produzierenden Zellen gesenkt werden konnte. Schließlich wurde das Verhältnis Aktivator Beads zu Zellen in Th1, Treg und der Kontrolle Th0 verringert, um den verstärkten Zelltod der Th1 und Treg nach Transfektion durch geringere Stimulusstärke zu verringern (Abbildung 13 und Abbildung 16). Die Stimulationsstärke von zehn Zellen zu einem Aktivator Bead (1:10) war ausreichend um die gewünschten Phänotypen zu erreichen.

Besonders umstritten sind die Bedingungen für die *in-vitro* Polarisierung von Th17 Zellen. Während alle anderen Subtypen IL-2 als essentiellen Faktor zum Überleben benötigen, wirkt IL-2 in der *in-vitro* Polarisierung von Th17 Zellen gegensätzlich. IL-2 fördert in Kombination mit TGF- β die Produktion des Treg Transkriptionsfaktors FoxP3 (Zheng et al. 2007) und inhibiert die IL-17 Produktion (Stockinger 2007; Wilson et al. 2007). Aus diesem Grund wurde IL-2 nicht in das Polarisierungsmedium für Th17 aufgenommen (siehe Tabelle 7 bis Tabelle 12). Ein kürzlich erschienenes Protokoll nutzt sogar α -IL-2 für die Th17 Polarisierung von murinen CD4⁺ Zellen (Sekiya & Yoshimura 2016). Zurzeit wird in der Arbeitsgruppe getestet, ob dieser Faktor auch die *in-vitro* Polarisierung von humanen Th17 Zellen verbessern kann. Während in murinen Th17 Zellen IL-6 und TGF- β als polarisierende Zytokine ausreichen (Veldhoen et al. 2006), sind diese Zytokine nicht suffizient um humane Th17 Zellen *in-vitro* zu generieren. Zur Polarisierung humaner Th17 Zellen ist zusätzlich IL-1 β und IL-23 nötig (Wilson et al. 2007; Acosta-Rodriguez et al. 2007; Ganjalikhani Hakemi et al. 2011). Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der Th17 Optimierung dieser Arbeit (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 7). Nach Zugabe von IL-1 β und IL-23 ergab sich eine spezifische IL-17 Produktion in Th17 Zellen gegenüber Th0. Mit 3 % IL-17 produzierenden Zellen war die Population allerdings sehr klein.

Neben der Zugabe spezifischer Zytokine beeinflusst auch die Stimulationsstärke die Polarisierungseffizienz. In Purvis et al. (2010) wird beschrieben, dass eine geringere Ratio von Beads zu Zellen bei α CD3/ α CD28 Bead Stimulation die IL-17 Produktion von Th17 Zellen fördert. Durch die Erniedrigung der Stimulationsstärke auf eine Ratio von 1:50 konnte die Menge an IL-17 produzierenden Zellen signifikant auf 3,9 % erhöht werden (Abbildung 15). Trotzdem blieb die Variabilität in der Effizienz der Th17 Polarisierung sehr hoch. Nicht bei jedem Donor konnte eine spezifische Produktion von IL-17 verglichen mit Th1, Th2 und Treg erreicht werden. Es scheint, als wäre die *in-vitro* Polarisierung von Th17 Zellen unter den in dieser Arbeit etablierten Bedingungen noch sensitiver gegenüber Donorvariabilität als die übrigen CD4⁺ Subtypen.

Außerdem war zu beobachten, dass die Bead Kontrolle Th0 1:50 eine hohe IL-17 produzierende Population zeigte, im Mittelwert vergleichbar mit Th17 Zellen. Wie bereits beschrieben (Purvis et al. 2010; Van Panhuys et al. 2014) ist die Stimulationsstärke äußerst kritisch für die Differenzierung. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die Bead Kontrolle Th0 1:50 allein durch die geringe Stimulationsstärke schon in Th17 Richtung entwickelt. Ohne das entsprechende Zytokinmilieu stieg zwar die IL-17 Produktion in Th0 1:50, die anderen Zytokine wie IFN- γ und IL-4 wurden aber trotzdem weiter produziert (Abbildung 15). Dies könnte darauf hinweisen, dass eine Komponente im Polarisierungsmedium von Th17 eine Inhibition von IL-17 induziert. Da die optimale Konzentration von TGF β immer noch kontrovers diskutiert wird (Manel et al. 2008; Ghaedi et al. 2015) und auch die Zugabe von α -IL-2 strittig ist (Manel et al. 2008; Sekiya & Yoshimura 2016), könnte durch die Optimierung dieser beiden Parameter eine weitere Verbesserung der Th17 Polarisierung erzielt werden.

Es könnte aber auch sein, dass es sich bei Th0 1:50 um eine Art intermediären Phänotyp zwischen Th0 und Th17 handelt. Diese Vermutung wird durch die Ca²⁺ Imaging Messungen gestützt (Abbildung 17). Hier zeigen die Th0 1:50 Zellen einen intermediären Kalziumphänotyp zwischen Th0 und Th17. Möglicherweise führt eine schwache T-Zell Rezeptor Stimulation ohne die für Th17 entsprechenden Zytokine zu den sogenannten „Doppelproduzenten“ einem enzephalogenen Subtyp, der sowohl IL-17 als auch IFN- γ produziert und beim MS Mausmodell EAE im zentralen Nervensystem gefunden wird (Gocke et al. 2007; Yang et al. 2009).

Auch für Th2 Zellen ist bereits gezeigt, dass die Stimulationsstärke Einfluss auf die Polarisierung hat und bei schwächerer Stimulation die Th2 Differenzierung gegenüber der Th1 Differenzierung begünstigt wird (Constant & Bottomly 1997). Eine schwache T-Zell Rezeptor Stimulation löst IL-4 Produktion aus (Badou et al. 2001) und fördert die Entwicklung in Richtung Th2 (Yamane & Paul 2013; Leitenberg & Bottomly 1999). Auch *in-vivo* konnte

gezeigt werden, dass ein starker Stimulus eine Entwicklung in Richtung Th1 fördert, während ein schwacher Stimulus CD4⁺ Zellen in Th2 Richtung treibt und sogar über Zytokinmilieu und Adjuvant dominiert. Die Hypothese ist, dass die Stimulusstärke über die Empfänglichkeit der Zelle auf ein bestimmtes Zytokin entscheidet (Van Panhuys et al. 2014). Während der Optimierung der *in-vitro* Polarisierung zeigte sich eine Abhängigkeit der Th2 Polarisierungseffizienz von der Stimulusstärke. Auch durch die Erhöhung der α -IFN- γ Konzentration (Abbildung 6) und die Zugabe von IL-13 und α -IL-12 (Abbildung 9) wurde keine signifikante und spezifische IL-4 Produktion erreicht. Jedoch resultierte die α -IFN- γ Erhöhung in einer Erniedrigung der IFN γ produzierenden Population in Th2. Zudem zeigte die Entfernung der Beads nach Tag 4 bereits eine Tendenz zum Anstieg der IL-4 Produktion (Abbildung 10). Aber erst nach Reduktion der Bead-Zell Ratio auf 1:20 konnte eine spezifische und signifikante IL-4 Produktion unter Th2 Polarisierungsbedingungen erreicht werden. (Abbildung 12 und Abbildung 14).

Am Ende der Optimierung und Etablierung der *in-vitro* Polarisierung war festzustellen, dass nie 100 % der Zellpopulation das charakteristische Signaturzytokin produzieren. Zwar ist die Zytokin Antwort der Gesamtpopulation gut durch die Polarisierung zu beeinflussen, aber eine Heterogenität auf Einzelzellebene ist sogar in Systemen mit Zellklonen zu beobachten (Rand et al. 2012). Bei den „Nicht-Produzenten“ handelt es sich aber nicht um Zellen, die ein anderes Zellschicksal eingeschlagen haben, sondern eher um eine stochastische Entscheidung. Es wurde gezeigt, dass die IFN- γ und IL-4 Produktion ein stochastisches Event ist, reguliert über intrinsische Faktoren der Zelle, die die Genexpression ermöglichen (Rand et al. 2012; Guo et al. 2005). Trotz Stimulus in Richtung IFN- γ und damit Th1 kann es sein, dass die Zelle aufgrund von einem stochastischen „*all-or-nothing* Prinzip“ gerade kein IFN- γ produziert. Die Zelle hat die Möglichkeit das Signal anzuschalten oder nicht, und das zu variablen Zeitpunkten (Rand et al. 2012). Das bei einer kurzen Momentaufnahme wie einer durchflusszytometrischen Färbung nicht alle Zellen der Population das bestimmte Signaturzytokin produzieren liegt daran, dass die Zellen nach der Restimulation nicht synchronisiert sind und die Zytokinproduktion zeitverzögert startet. Hat eine Zelle aber das Schicksal der IFN- γ produzierenden Zelle eingeschlagen, bleibt dieses Schicksal auch nach Restimulation stabil (Helmstetter et al. 2015).

Für die *in-vitro* Polarisierung wurde die gesamte CD4⁺ Population eines Spenders eingesetzt. In dieser Population ist ein geringer Teil Effektor CD4⁺ Zellen vorhanden die im Spender bereits Antigen Kontakt hatten. Laut Helmstetter et al. (2015), können diese ihr Schicksal nicht mehr ändern. Dieser Fakt liefert eine Erklärung für die geringen Mengen an Zellen innerhalb eines polarisierten Subtyps, die trotz Polarisierung weiterhin andere Signaturzytokine produzieren (Abbildung 13 bis Abbildung 16). Aus diesem Grund, wäre der

nächste logische Schritt naive CD4⁺ Zellen anstatt der CD4⁺ Gesamtpopulation für die Polarisierung einzusetzen

Das aktuell verwendete Isolationsprotokoll (Dynabeads® Untouched™ Human CD4 T Cells) isoliert die CD4⁺ Gesamtpopulation über CD8, CD14, CD16a, CD16b, CD19, CD36, CD56, CD123 und CD235a Antikörper gecoatete Beads aus PBMCs über die Depletion von B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Dendritischen Zellen, CD8⁺ T-Zellen, Granulozyten und Erythrozyten. Die bekannten Marker für Memory T-Zellen sind CD127, CD45, CD62L, CD69 und CCR7 (Rosenblum et al. 2015). Laut Datenblatt des Herstellers ist keiner dieser Antikörper gegen Memory T-Zellen im Kit inkludiert, was bedeutet, dass die CD4⁺ untouched Zellen tatsächlich eine Mischpopulation aus naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen sind. Wenn letztere bei der Isolation ebenfalls depletiert würden, könnte getestet werden, ob die *in-vitro* Polarisierung der CD4⁺ T-Zell Subtypen mit einer reinen naiven CD4⁺ Population noch optimiert werden kann.

7.2 Charakterisierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in CD4⁺ T-Zell Subtypen

Speichergesteuerter Kalziumeinstrom ist essentiell für die Immunzellfunktion. Die Aktivierung des T-Zell Rezeptors führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch ER-Speicherentleerung und Aktivierung von Orai über STIM. Änderungen des intrazellulären Kalziums führen zu veränderter Gentranskription. Beispielsweise wird die Zytokinproduktion und die Differenzierung in den verschiedenen CD4⁺ T-Zell Subtypen über Kalzium und NFAT beeinflusst (Feske et al. 2001; Gwack et al. 2008; Hogan et al 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kalziumsignale humaner *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen untersucht.

7.2.1 CD4⁺ Subtypen haben charakteristische Kalziumphänotypen

Die Charakterisierung der Kalziumsignale humaner, *in-vitro* polarisierter CD4⁺ T-Zell Subtypen, erfolgte sowohl nach Thapsigargin Stimulus (Abbildung 17), als auch über T-Zell Rezeptor vermittelte Aktivierung mittels αCD3/αCD28 Aktivator Beads (Abbildung 30). Alle Subtypen zeigten signifikante Unterschiede in ihren Kalziumsignalen nach passiver Speicherentleerung durch Thapsigargin und wiesen charakteristische Kalziumphänotypen auf (Abbildung 17).

Treg zeigten die größte Kalziumantwort nach Speicherentleerung mit Thapsigargin mit signifikant höherem Kalziumpeak und Plateau verglichen zu Th0. Das Kalziumsignal in Th1 war signifikant kleiner als in Treg und Th0. Auch Th2 zeigten signifikant kleinere

Einstromrate, Kalziumpeak und Plateau als Th0 Zellen. Verglichen mit Th1 war die Kalziumantwort ebenfalls kleiner. Th17 Zellen zeigten die langsamste Einstromrate und wiesen zudem ein stark verkleinertes Kalziumplateau auf. Der Kalziumpeak in Th17 war signifikant kleiner als in Th0 Zellen, verglichen mit Th2 aber vergrößert. Damit ergab sich für Th17 zusätzlich ein von den anderen Subtypen abweichender und charakteristischer Verlauf, mit einem stark verminderten Kalziumplateau im Verhältnis zum Kalziumpeak.

Es ist bekannt, dass Kalziumsignale als Antwort auf T-Zell Rezeptor Stimulation nicht nur als binärer Switch fungieren, sondern Kinetik, Amplitude und Dauer des Signals differenzierte Informationen übermitteln und spezifisch die Gentranskription beeinflussen (Lewis 2001). Dass die CD4⁺ T-Zell Subtypen mit ihren spezifischen Aufgaben in der adaptiven Pathogenabwehr charakteristische und differenzierte Kalziumphänotypen aufweisen liegt damit nahe. Die molekularen Ursachen für die charakteristischen Kalziumsignale von Th17 Zellen könnten möglicherweise an einem höheren relativen Anteil an Orai2 zu Orai1 und Orai3 liegen. Orai 2 zeigt die schnellste Aktivierung von iCRAC (Lis et al. 2007). Die Kalzium-abhängige Inaktivierung heterologer Orai2 und Orai3 Ströme ist schneller als bei Orai1 (Lis et al. 2007; Lee et al. 2009; Frischauf et al. 2011). Ein höherer relativer Anteil an Orai 2 in den CRAC Kanalmultimeren von Th17 Zellen könnte eine Erklärung für den einzigartigen Th17 Kalziumphänotyp liefern. Zwar unterscheiden sich die mRNA Level von Orai2 in Th17 nicht signifikant von den Orai2 Level der anderen CD4⁺ T-Zell Subtypen, jedoch wäre eine Aussage über die Menge an Orai2 auf Proteinebene möglicherweise aussagekräftiger. Dieser Vergleich war allerdings bisher aufgrund mangelnder Spezifität existierender Antikörpern gegen Orai2 nicht möglich.

Die Stimulation mit Thapsigargin ist verglichen mit der T-Zell Rezeptoraktivierung sehr stark und irreversibel. Da der SERCA Inhibitor Thapsigargin die intrazellulären ER-Speicher passiv entleert, wird bei dieser Stimulation die TCR Signalkaskade umgangen (Prakriya & Lewis 2015). Um die Kalziumantwort der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen auch nach einem physiologischeren Stimulus zu charakterisieren wurde der speichergesteuerte Kalziumeinstrom über α CD3/ α CD28 gekoppelte Beads ausgelöst (Abbildung 30). Hierbei wurde die CD3/CD28 Ko-Stimulation und damit die physiologische Aktivierung des T-Zell Rezeptors über antigenpräsentierende Zellen imitiert. Treg zeigten hier das größte Signal verglichen mit den restlichen Subtypen, in Übereinstimmung mit den Kalziumsignalen die nach Aktivierung mit Thapsigargin gemessen wurden. Das höhere Kalziumsignal das bei Treg beobachtet wurde, deckt sich mit den Ergebnissen von Kaufmann et al. (2015). Dort zeigten unbehandelte murine Treg nach Aktivierung mit α CD3 höhere Kalziumsignale als

Th1 und Th17. Allerdings war in derselben Studie die Kalziumantwort von murinen Th1 und Th17 Zellen vergleichbar.

In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Th1 nach Thapsigargin Stimulus ein kleineres Signal als Th0 und nach Treg das größte Kalziumsignal aller Subtypen. Nach der rezeptorvermittelten Aktivierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms war in Th1 kein signifikanter Unterschied im Kalziumsignal zu Th0 zu detektieren. In Th2 waren nach der Aktivierung durch Thapsigargin die Kalziumsignale kleiner als in Treg, Th1 und Kontrollzellen Th0. Bei rezeptorvermittelter Stimulation war Einflussrate und Kalziumpeak jedoch signifikant größer als Th0 und als Th1. Auch Th17 Zellen wiesen Unterschiede zur Thapsigargin-vermittelten Aktivierung auf. Dort zeigten Th17 ein signifikant kleineres Kalziumsignal als Th0, Th1 und Th2. Nach rezeptorvermittelter Aktivierung zeigten Th17 das zweitgrößte Kalziumsignal aller gemessenen Subtypen. Die Bead Kontrollen Th0 1:20 und Th0 1:50 zeigten in Folge beider Stimulationen einen intermediären Phänotyp.

Eine Erklärung für die gemessenen Unterschiede könnte die Art des Stimulus sein. Die Ergebnisse untermauern nochmals wie kritisch die Art und Weise der Stimulation das Kalziumsignal verändernd kann. Die Stimulation mit Thapsigargin bewirkt eine spezifische und irreversible Inhibition der SERCA Pumpen (Lytton et al. 1991). Diese unterbindet die Aufnahme von Kalzium ins ER, weshalb es durch die Leckströme von Kalzium aus dem ER zur Speicherentleerung kommt. Nachteilig bei dieser Art der Stimulation ist, dass die Signalkaskade vor Speicherentleerung über Phospholipase C γ (PLC γ) und IP $_3$ komplett umgangen wird (Prakriya & Lewis 2015). Über die Aktivierung durch α CD3/ α CD28 gekoppelte Beads wird die Aktivierung des TCR nachgeahmt und ist damit eine Annäherung an die physiologische Aktivierung des TCR über antigenpräsentierende Zellen. Obwohl sich die Kalziumphänotypen in ihrem relativen Verhältnis zueinander unterscheiden, konnten dennoch in beiden Fällen charakteristische Kalziumphänotypen für *in-vitro* polarisierte CD4 $^+$ T-Zell Subtypen festgestellt werden.

Eine vollständige Charakterisierung der Kalziumsignale in humanen CD4 $^+$ T-Zell Subtypen wurde bis heute nicht durchgeführt. Im Jahr 2000 wurden von Fanger und Kollegen die Kalziumsignale von murinen T-Zell Klonen nach Speicherentleerung mit Thapsigargin untersucht. Hier konnten hauptsächlich Unterschiede in der Plateauphase festgestellt werden. Nach der *in-vitro* Polarisierung humaner CD4 $^+$ Zellen unterschieden sich die Kalziumsignale zwischen Th1 und Th2 nach Speicherentleerung mit Thapsigargin sowohl in Einflussrate, Peak und Plateau (Abbildung 17), wobei die Größe der Unterschiede in der Plateauphase von Fanger et al. (2000) vergleichbar mit dem in dieser Arbeit gemessenen Unterschieden im Plateau von Th1 und Th2 sind. Die Einflussrate stellt hierbei eine im

Ca^{2+} -Imaging gemessene empfindliche Größe dar, die eine direkte Sicht auf ein verändertes Signal ermöglicht. Außerdem ist erwähnenswert, dass Fanger und Kollegen (2000) mit T-Zell Klonen gearbeitet haben, welche weniger Variabilität innerhalb der Population zeigen. Acht Jahre später, wurden die Unterschiede zwischen murinen, *in-vitro* polarisierten Th1, Th2 und Th17 Zellen untersucht (Weber et al. 2008). Die Aktivierung der Kalziumsignale erfolgte über APCs (Antigenpräsentierende Zellen). Mittels dieses physiologischeren Stimulus zeigten Th1 den größten Kalziumeinstrom, Th2 den kleinsten und Th17 ein intermediäres Kalziumsignal. Die gemessenen Unterschiede waren hauptsächlich auf Unterschiede im Plateau zurückzuführen, der Kalziumpeak unterschied sich in Weber et al. (2008) nicht signifikant zwischen den Subtypen

Nach Aktivierung des Kalziumeinstroms durch Thapsigargin konnten in dieser Arbeit signifikante Unterschiede in allen quantifizierten Parametern Kalzium Einstromrate, Peak und Plateau gemessen werden. Durch Imitation einer immunologischen Synapse durch $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ gekoppelte Beads zeigten Th17 in den Experimenten dieser Arbeit nach Treg das größte Kalziumsignal, gefolgt von Th2. Das Kalziumsignal in Th1 war ähnlich zur Kontrolle Th0.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen in Weber et al. (2008) und den Ergebnissen dieser Arbeit könnten durch unterschiedliche Faktoren zustande kommen. In der Studie von Weber und Kollegen wurden APCs als Stimulus verwendet. Für die Charakterisierung des Signals wurde in dieser Arbeit das Ca^{2+} *readdition* Protokoll mit der Aktivierung über Thapsigargin bzw. die Aktivierung von SOCE über $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ gekoppelte Beads eingesetzt. Bei der Verwendung eines physiologischen Stimulus mit antigenpräsentierenden Zellen kann die Antigen-abhängige Stärke des Stimulus variieren. Die Art des gewählten Adjuvants kann die Dauer der T-Zell/APC Interaktion beeinflussen, was in unterschiedlichen Kalziumantworten *in-vivo* resultiert (Van Panhuys et al. 2014). Bei der Thapsigargin-induzierten Speicherentleerung ist die Stimulusstärke immer gleichbleibend stark. Den gleichen Vorteil bietet sich bei der Verwendung von Beads bei welchen zusätzlich der natürliche Signalweg über Rezeptorstimulation aktiviert wird. Um eine erste Untersuchung der Kalziumphänotypen durchzuführen, sind möglicherweise artifizielle und damit gleichbleibende Stimuli wie Beads oder Thapsigargin die geeignete Wahl, da hiermit die Variabilität des Kalziumsignals über Zellqualität der APCs, Dauer des T-Zell/APC Kontakts bzw. gewähltes Adjuvants ausgeschlossen werden kann. Da die *in-vitro* polarisierten CD4^{+} T-Zell Subtypen robuste, aber sich teilweise je nach Stimulationsart unterscheidende Kalziumphänotypen aufwiesen, wäre eine Aktivierung von SOCE über APCs der nächste logische Schritt.

Der Vergleich dieser Ergebnisse bekräftigt nochmals wie kritisch die Art und Weise der Stimulation für den speichergesteuerte Kalziumeinstrom ist. Durch die Art des Stimulus könnte es zu Unterschieden in den Verhältnissen der Kalziumsignale der CD4⁺ T-Zell Subtypen kommen. Dass sich jedoch auch Abweichungen zwischen den Ergebnissen nach Bead Stimulation in dieser Arbeit und in den Ergebnissen nach Stimulation mit APCs ergeben könnte an unterschiedlichen experimentellen Herangehensweisen liegen.

Sowohl in der Studie von Fanger et al. (2000) als auch in Weber et al. (2008) und Kaufmann et al. (2015) wurden murinen T-Zellen verwendet. Obwohl murine Zellen häufiger als humane Zellen in der immunologischen Forschung eingesetzt werden, weisen sie doch erhebliche Unterschiede zu humanen Zellen auf, wodurch die Ergebnisse nur bedingt auf humane Zellen zu übertragen sind. So exprimieren humane Zellen nach Aktivierung, im Gegensatz zu Mauszellen, MHC Klasse II Moleküle. Ein weiteres Beispiel für gravierende Unterschiede zwischen Maus und Mensch liefert eine Studie aus dem Jahr 2011 (Seok et al. 2013). Diese vergleicht die genomische Antwort nach einer akuten systemischen Entzündungsreaktion, ausgelöst durch Faktoren wie stumpfe Traumata, schwere Verbrennungen oder bakterielle Endotoxin Exposition, mit den korrespondierenden Mausmodellen. Diese groß angelegte Studie zeigt, dass das durch die systemischen Entzündungen ausgelöste, systemische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) nur geringe Schwankungen zwischen den Patienten aufweist, sich aber durch die Mausmodelle nicht reproduzieren lässt. Die Ergebnisse dieser Studie machen deutlich, dass die in der Forschung eingesetzten Mausmodelle menschliche Erkrankungen nur unvollständig oder verändert reproduzieren können (Seok et al. 2013) und Erkenntnisse aus dem murinen System nicht immer zu 100 % auf Menschen übertragbar sind. Die Diskrepanzen zu den Ergebnissen dieser Arbeit und den teilweise publizierten Kalziumphänotypen der CD4⁺ T-Zell Subtypen könnten also auf die Verwendung von unterschiedlichen Zellsystemen zurückzuführen sein. Somit ist es möglich, dass sowohl Unterschiede in Art und Weise der Stimulation der Kalziumsignale als auch das Zellsystem selbst zu abweichenden Ergebnissen bei der Bestimmung der Kalziumphänotypen führen.

Eine Möglichkeit um zu bestätigen welche der Phänotypen humanen T-Zell Subtypen *in-vivo* entsprechen, wäre bereits differenzierte CD4⁺ Subtypen direkt aus dem Blut zu isolieren und deren Kalziumsignale zu messen. Dies ist mittels durchflusszytometrischer Sortierung der Subtypen aus CD4⁺ Zellen anhand von Oberflächenmarkern oder über spezifische Kits möglich. Mit dieser Vorgehensweise wäre es möglich humane Zellen zu messen und trotzdem die fragile *in-vitro* Polarisierung zu umgehen. Auch ein Vergleich mit Patientenmaterial von CD4⁺ Subtypen assoziierten Krankheiten wäre einfacher.

Limitierender Faktor ist hierbei jedoch die sehr geringe Zellzahl der direkt aus humanem Blut isolierten Subtypen.

Um herauszufinden, ob sich die unterschiedlichen Kalziumprofile der CD4⁺ T-Zell Subtypen mit den Expressionsmengen der CRAC-Gene korrelieren lassen, wurden die Expressionsmengen der CRAC Komponenten bestimmt. Orai besitzt drei Homologe, die einen unterschiedlich starken SOCE bewirken. Orai1 generiert einen größeren Kalziumeinstrom als Orai2 und Orai3, während Orai3 alleine nur zu einem kleinen speichergesteuerten Kalziumeinstrom führt (Mercer et al. 2006). Die beiden Paralogue des Aktivormoleküls STIM haben unterschiedliche Funktionen. Der Aktivator STIM1 aktiviert Orai nach Speicherentleerung (Deng et al. 2009; Lewis 2007; Soboloff et al. 2012). Von Yarkoni & Cambier (2011) wurde gezeigt, dass die STIM1 Expressionslevel eine wichtige Rolle in der Regulation des Kalziumeinstroms in B- und T-Zellen spielen. STIM2 ist ein schwächerer Aktivator des speichergesteuerten Kalziumeinstroms über Orai (Bird et al. 2009).

Bei einer Korrelation der Expressions-Level mit den unterschiedlichen Kalziumphänotypen der CD4⁺ T-Zell Subtypen, wäre bei vergrößertem SOCE eine Hochregulation von Orai1 und STIM1 oder möglicherweise erniedrigte Orai2 und STIM2 Level zu erwarten. Innerhalb der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen konnte kein Unterschied in den Orai1 Expressionsleveln festgestellt werden. Auch STIM1 zeigte keine Unterschiede in der Expression zwischen den Subtypen. Ebenso wenig zeigten die Homologe Orai2, Orai3 und STIM2, sowie die Spleißvarianten STIM2.1 und STIM2.2 eine Veränderung in der relativen mRNA Menge zwischen den Subtypen (Abbildung 18). Auch auf Proteinebene konnte kein Unterschied zwischen den Expressionsleveln der SOCE Komponenten in den Subtypen festgestellt werden (Abbildung 19). Die Detektion von Orai1, STIM1 und STIM2 im Proteinblot zeigte keinen Unterschied in der Proteinmenge zwischen Th0, Th1 und Treg. Aufgrund des Mangels an spezifischen Antikörpern war es auf Proteinebene bisher nicht möglich Orai2 und Orai3 in den CD4⁺ Subtypen nachzuweisen. Diese könnten aber die Kalziumphänotypen maßgeblich beeinflussen. Durch unterschiedliche relative Anteile von Orai2 und Orai3 innerhalb der Kanalmultimere könnten beispielsweise die Unterschiede im Plateau der Subtypen erklärt werden, da Orai2 und Orai3 Ströme eine schnellere Kalzium-abhängige Inaktivierung zeigen als Orai1 (Lis et al. 2007; Lee et al. 2009; Frischauf et al. 2011). Auch die anhand von Durchflusszytometrie detektierten Proteinmengen von Orai1 und STIM1 unterschieden sich nicht. Im Western Blot gegen STIM2 konnten zusätzliche zur erwarteten Bande von STIM2 (STIM2.1 und STIM2.2) auf Höhe von ~98kDa, noch weitere Banden detektiert werden. Bei den Banden auf Höhe von ~81 kDa könnte es sich um eine weitere STIM2 Spleißvariante (STIM2.3) handeln, die, obwohl sie in den Datenbanken

vorhergesagt wird, bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte (Miederer et al. 2015). Ob es sich um eine möglicherweise Subtyp-spezifische oder Gewebe-spezifische Variante handelt, oder der Nachweis generell noch nicht möglich war ist ungeklärt. Eine genauere Untersuchung auf mRNA Ebene innerhalb der Subtypen könnte aufklären, ob STIM2 Spleißvarianten differentiell in den Subtypen exprimiert werden. Dies wäre in Zukunft ein interessanter Ansatzpunkt für die Aufklärung der differentiellen Kalziumsignale, da die Funktionen dieser Spleißvariante bisher unklar ist.

Bei der Größe des speichergesteuerten Kalziumeinstroms spielen nicht nur die absoluten Proteinmengen eine Rolle, sondern auch das STIM1 zu Orai1 Verhältnis (Kilch et al. 2013; Scrimgeour et al. 2009; Hoover & Lewis 2011). Das Verhältnis von STIM1 zu Orai1 unterschied sich in Treg, Th1 und Th0 jedoch nicht signifikant. Da jedoch nicht nur die absoluten Proteinmengen, sondern auch andere Faktoren, wie beispielsweise posttranslationale Modifikationen der SOCE Komponenten die Größe des Kalziumeinstroms beeinflussen, wurde mittels siRNA Experimenten untersucht, ob sich die Herunterregulation einzelner Komponenten (STIM2.1 und Orai1) unterschiedlich auf die Kalziumsignale einzelne Subtypen auswirkt. Obwohl hier die Herunterregulation sowohl von STIM2.1 als auch von Orai1 teilweise unterschiedliche Effekte hatten (ausführlicher siehe 7.2.2 und 7.2.3), lieferten diese Experimente keine vollständige Erklärung für die charakteristischen Kalziumphänotypen der T-Zell Subtypen.

Die relativen Expressionsunterschiede der mRNA sowie die Proteinlevel und die siRNA Versuche von Orai und STIM lassen vermuten, dass die absoluten Level von STIM und Orai nicht die alleinige Ursache für die unterschiedlichen Kalziumphänotypen sind. Möglicherweise beeinflussen andere Spleißvarianten bzw. andere Kanäle oder Regulatoren den speichergesteuerten Kalziumeinstrom der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen.

Th0 und Th1 zeigten große Unterschiede im Kalziumsignal, bei gleicher Stimulationsstärke. Der Hauptunterschied in der Polarisierung dieser Subtypen war die Zugabe von IL-12 bei Th1 Zellen. Um isoliert die Effekte eines einzelnen Zytokin auf Kalziumsignal zu untersuchen, wurden naive Zellen mit IL-2 und IL-12 über 5 Tage behandelt. In den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass bereits die Zugabe von IL-12 die Kalziumsignale verglichen mit den Kontrollzellen signifikant erniedrigt (Abbildung 20A). Diese Verringerung des Kalziumsignals ging mit einer Hochregulation des Th1-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet einher (Abbildung 20B). Die unstimulierten CD4⁺ Zellen wiesen damit schon einen Th1-ähnlichen Phänotyp auf. Diese Ergebnisse zeigten, dass IL-12 bereits ohne Stimulation die Zellen in Th1 Richtung treibt. Da IL-12 bereits als ein wichtiger Faktor in der Th1 *in-vitro*

Polarisierung bekannt ist (Zhu et al. 2010), bestätigen diese Ergebnisse das bisherige Wissen zur Th1 Polarisation. Eine weitere Möglichkeit für die beobachteten Effekte ist, dass die Präsenz von IL-12 möglicherweise bereits im CD4⁺ Pool enthaltene Th1 restimulieren könnte, woraufhin diese vermehrt expandieren. Bei der CD4⁺ *untouched* Population mit dem Invitrogen CD4⁺ *untouched* Isolations Kit handelt es sich um die CD4⁺ Gesamtpopulation. Das bedeutet, dass hier auch bereits differenzierte, nicht nur naive Zellen herausortiert werden. Das Verschieben der Population in Richtung Th1 durch alleinige Zugabe von IL-12 zeigte dass, der Stimulus in eine weniger wichtige Rolle zu spielen scheint, im Gegensatz zu Th2 und Th17, als die Anwesenheit des polarisierenden Zytokins.

Die Daten zeigen damit, dass allein die Anwesenheit von IL-12 die CD4⁺ Zellen in Richtung Th1 treibt. In Th1 Zellen scheint damit im Gegensatz zu Th2 und Th17 (vgl. Diskussion 7.1) der Stimulus eine weniger wichtige Rolle zu spielen als die Anwesenheit des polarisierenden Zytokins.

7.2.2 Einfluss der dominant-negativen Spleißvariante STIM2.1 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom von *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen

Die Rolle von STIM1 und STIM2 in CD4⁺ T-Zell Subtypen im Zusammenhang mit EAE (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) ist bereits in *knockout* Studien thematisiert worden (Ma et al. 2010; Schuhmann et al. 2010). Die Deletion von STIM1 führt zu einer EAE Resistenz, die Deletion von STIM2 zu einer milderen Form von EAE. In allen Bedingungen ist eine veränderte Produktion von IFN- γ und IL-17, trotz Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR γ -t, zu beobachten.

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl ein T-Zell spezifischer Doppel-*knockout* (STIM1^{-/-}, STIM2^{-/-}) (Oh-Hora et al. 2008), als auch die Deletion von STIM1 zu einer verminderten Anzahl Treg führt (Desvignes et al. 2015). Das Fehlen von STIM1 und STIM2 resultiert in einer veränderten Zytokinproduktion (Schuhmann et al. 2010; Oh-Hora et al. 2008; Ma et al. 2010). Keine dieser Studien berücksichtigen die Rolle der neuen dominant-negativen STIM2 Spleißvariante STIM2.1 (Miederer et al. 2015; Rana et al. 2015). Aus diesem Grund sollte zunächst geklärt werden, ob die Herunterregulation von STIM2.1 einen Einfluss auf die Zytokinproduktion hat (Abbildung 21). Die siRNA Behandlung zeigte keinen Einfluss auf die Menge an Signaturzytokin produzierenden Zellen. In diesem Zusammenhang konnte anhand der Kontrolle auch zusätzlich geprüft werden, dass die Transfektion selbst Einfluss auf die Polarisation nimmt.

Um die Rolle der neuen Spleißvariante in der differentiellen Regulation des speichergesteuerten Kalziumeinstroms von CD4⁺ T-Zell Subtypen genauer zu untersuchen, wurde diese mittels siRNA herunterreguliert. Wie bereits in Miederer et al. gezeigt lag die Effizienz der Herunterregulation von STIM2.1 bei 44±6 % erniedrigter cDNA Expression verglichen mit der *non-silencing* Kontrolle. Es wurden keine *off-target* Effekte auf STIM1 und STIM2.1 festgestellt.

Nach Herunterregulation der dominant-negativen Spleißvariante STIM2.1 zeigte sich in den Kontrollzellen Th0 sowie in Th2 und Th17 der erwartete Anstieg des Kalziumsignals. Wie bereits in Miederer et al. (2015) beschrieben kommt es durch Stilllegung des negativen Regulators zu einem vergrößerten speichergesteuerten Kalziumeinstrom. Überraschenderweise ist dieser Effekt in Th1 und Treg nicht zu beobachten, obwohl die qRT-PCR Ergebnisse der Subtypen zuvor keine erhöhten oder erniedrigten STIM2.1 Level zeigten. Diese Subtypen zeigten keinen Unterschied in SOCE nach Herunterregulation von STIM2.1. Es ist bekannt, dass in STIM2^{-/-} Mäusen die Signaturzytokinproduktion einzelner Subtypen selektiv beeinflusst ist. Der *knock-out* von STIM2 hat keinen Einfluss auf die IFN- γ und IL-4 Produktion, IL-17 ist aber signifikant erniedrigt (Schuhmann et al. 2010). Zu bedenken ist, dass in dieser Studie der positive Regulator STIM2.2, sowie der negative Regulator STIM2.1 ausgeschaltet wurden. In dieser Arbeit zeigen Th1 und Treg eine geringere Sensitivität auf die inhibitorische Wirkung von STIM2.1. Es könnte sein, dass sich sowohl STIM2.2 (früher STIM2) als auch die Spleißvariante STIM2.1 in ihrem Einfluss innerhalb der Subtypen unterscheiden. Eine differentielle Regulation über STIM2 und seiner Spleißvariante könnte somit eine Teil-Erklärung für das Zustandekommen der unterschiedlichen Kalziumphänotypen sein, die in differentieller Zytokinproduktion resultieren, welche abhängig von SOCE ist. (Feske et al. 2001; Gwack et al. 2008; Hogan et al. 2010). Zu dieser Theorie passt, dass die Subtypen, welche verglichen mit den anderen Subtypen offensichtlich größere Kalziumsignale aufwiesen (Th1 und Treg) nicht durch den Inhibitor STIM2.1 inhibiert und dadurch nicht von der Herunterregulation beeinflusst wurden (Abbildung 22). In den Zellen mit kleinerem Kalziumsignal (Th2 und Th17) scheint STIM2.1 dagegen eine stärkere inhibitorische Rolle zu spielen, da diese nach der Herunterregulation des Inhibitors größere Kalziumantworten nach Thapsigarginaktivierung zeigen (Abbildung 23 und Abbildung 24).

Durch die Herunterregulation von STIM2.1 konnte nur ein moderater Anstieg des zytosolischen Kalziums, bzw. keinen Anstieg in Th1 und Treg, bewirkt werden. Dass die Unterschiede klein waren, ist nicht überraschend, betrachtet man die Tatsache, dass das Verhältnis von STIM2.1 zu STIM2.2 nach Aktivierung sinkt und trotz verbleibender 56 % mRNA Restaktivität noch ein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden kann. Obwohl die

somit gemessenen Unterschiede klein sind, können diese Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentrationen bereits weitreichende transkriptionelle Veränderungen zur Folge haben (Kar et al. 2012; Kar & Parekh 2015). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung der NFAT Homologe unterschiedliche subzelluläre Kalziumsignale benötigen. Die Aktivierung von NFAT1 ist direkt an die Orai Aktivität gekoppelt ist und wird selektiv durch Kalzium Mikrodomänen nahe das Orai Kanals aktiviert. Die Aktivierung von NFAT4 verläuft sowohl über Kalzium Mikrodomänen als auch über eine Erhöhung der globalen Kalziumkonzentration (Kar & Parekh 2015)

7.2.3 Einfluss von Orai 1 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom von in-vitro polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen

Im nächsten Teil wurde die Rolle von Orai1 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom des proinflammatorischen Subtyps Th1 und des regulatorischen Subtypes Treg untersucht. Th1 und die Kontrolle Th0 zeigten nach Herunterregulation von Orai1 die erwartete Verkleinerung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms (Gwack et al. 2008; Kim et al. 2013; Kaufmann et al. 2015). Das Ausmaß der Verkleinerung war in Kontrolle und Th1 ähnlich in Peak und Plateau. Die in dieser Arbeit gemessenen Effekte auf SOCE waren geringer als in Orai1 *knockout* Studien (Gwack et al. 2008; Kim et al. 2013; Kaufmann et al. 2015). Doch selbst in diesen Studien war trotz Fehlen von Orai1 weiterhin SOCE zu messen. Die Homologe Orai2 und 3 bewirken eine Restaktivität des speichergesteuerten Kalziumeinstroms (Kaufmann et al. 2015; Gwack et al. 2008). In den Messungen in dieser Arbeit wurde nur eine siRNA vermittelte Herunterregulation von Orai1 vorgenommen, mit einer Restaktivität von Orai und der zusätzlichen Beteiligung von Orai2 und Orai3 am speichergesteuerten Kalziumeinstrom. Trotzdem konnte eine signifikante Erniedrigung von SOCE in Th1 Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis passt zu den bereits publizierten Daten, dass der speichergesteuerte Kalziumeinstrom in Th1 hauptsächlich über Orai1 vermittelt wird (Kaufmann et al. 2015). Eine weitere Studie zeigt keinen Unterschied auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom nach Deletion von Orai1 (Vig et al. 2008). Wie aber bereits in Gwack et al. (2008) diskutiert, entstehen diese Unterschiede sowohl durch die Deletionsmethode (*gene-trapping*) als auch durch die Messung direkt aus der Maus entnommener, vermutlich hauptsächlich naiver Zellen. Diese zeigen einen geringeren Effekt auf SOCE durch das Fehlen von Orai1.

Interessanterweise war der Effekt auf SOCE nach Orai1 Herunterregulation in Treg nicht zu beobachten. Die Rate stieg nach siRNA Behandlung gegen Orai1 auf 180 %, Kalziumpeak auf 119 % und Plateau auf 115 %. In der Studie von Kaufmann et al. (2015) ist der

Kalziumeinstrom von Th1 als auch von Treg aus Orai1 \neg Mäusen erniedrigt. Die Daten aus dieser Arbeit sprechen hingegen dafür, dass der speichergesteuerte Kalziumeinstrom von humanen Treg zumindest teilweise über einen anderen Kanal als Orai1 getragen wird. Hierfür spricht auch das Ergebnis, dass der dominant negative Regulator STIM2.1 keinen Einfluss auf SOCE in Treg hatte (Abbildung 22). Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Entleerung der Speicher scheint anders reguliert zu sein als üblicherweise erwartet. Hinzu kommt, dass die Deletion bzw. das Blocken von Orai1 keinen Einfluss auf die FoxP3 Produktion und Treg Entwicklung zeigt (Gwack et al. 2008; Kim et al. 2013; Kaufmann et al. 2015). Eine Abhängigkeit von FoxP3 und STIM (Oh-Hora et al. 2008; Desvignes et al. 2015) sowie NFAT (Müller & Rao 2010; Tone et al. 2008; Y. Wu et al. 2006) konnte jedoch bereits gezeigt werden. Kim und Kollegen (2013) argumentieren, dass Treg möglicherweise geringere Kalziumlevel benötigen um FoxP3 zu exprimieren, weshalb der verbleibende Kalziumeinstrom nach Blocken von Orai1 ausreicht um Treg zu differenzieren. Die Daten dieser Arbeit zeigten stark vergrößerte Kalziumlevel in Treg nach Aktivierung mit Thapsigargin und über TCR (Abbildung 17 und Abbildung 30) was gegen diese Argumentation spricht. Auch Kaufmann und Kollegen (2015) bemerkten diese Diskrepanz. Hier wird geschlossen, dass durch den Doppel-*knockout* von STIM schwerere Defekte in SOCE hervorgerufen werden. Zwar kann eine Restaktivität des speichergesteuerten Kalziumeinstroms nach dem Orai1 *knockout* von Orai2 und Orai3 aufrechterhalten werden, jedoch ist dieser stark verringert (Kaufmann et al. 2015). Da Treg einen stark vergrößerten Kalziumeinstrom verglichen mit den anderen Subtypen zeigten (Abbildung 17 und Abbildung 30) ist es eher unwahrscheinlich, dass die Restaktivität von Orai2 und Orai3 zwar die Bildung von Treg aufrechterhalten kann, nicht aber die von Th1 und Th17, die deutlich geringere Kalziumlevel nach Aktivierung zeigten (Abbildung 17 und Abbildung 30). Eine schlüssigere Erklärung wäre die Mitwirkung eines anderen Kanals, welcher ebenfalls von STIM beeinflusst wird und somit in Konkurrenz zur Aktivierung von Orai1 steht.

Auch naive CD4⁺ Zellen zeigten einen vergrößerten Kalziumeinstrom verglichen mit Th1 und Th2 (Gwack et al. 2008) und zusätzlich ist der von Orai1 getragene Kalziumeinstrom nicht nötig für die CD4⁺ Entwicklung im Thymus (Gwack et al. 2008; Vig et al. 2008). Auch hier könnte ein weiterer, STIM-abhängiger Kanal beteiligt am speichergesteuerten Kalziumeinstrom naiver CD4⁺ Zellen beteiligt sein.

Welche Rolle die Orai Homologe Orai2 und Orai3 im speichergesteuerten Kalziumeinstrom der verschiedenen Subtypen spielen, muss in Zukunft genauer untersucht werden.

7.2.4 Einfluss von spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanälen auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom von *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen

Während die Rolle von spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanälen in erregbaren Zellen gut charakterisiert ist, bleibt ihre Rolle in nicht-erregbaren Zellen wie T-Zellen kontrovers diskutiert.

CD4⁺ Zellen exprimieren sowohl die regulatorische als auch die Poren-formende Untereinheit der Ca_v1 Kanäle. Ca_vβ3 und Ca_vβ4 defiziente CD4⁺ Zellen zeigen eine reduzierte T-Zell Rezeptor vermittelte Kalziumantwort. Auch die NFAT Translokation und Zytokinproduktion sind verändert (Badou et al. 2006). Die Deletion von Ca_v1.4 bewirkt eine Reduktion von CD4⁺ SP Thymozyten um 50 % und auch die Kalziumantwort naiver CD44^{lo} CD4⁺ Zellen ist beeinträchtigt. Auf Effektor Zellen zeigte der *knockdown* jedoch kaum Auswirkungen (Omilusik et al. 2011). Damit scheint Ca_v1.4 einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase naiver CD4⁺ Zellen zu haben und im Gegensatz zu Orai1 eine Rolle in der CD4⁺ Entwicklung im Thymus zu spielen. Zusätzlich blocken die Ca_v1 Inhibitoren Nifedipine (50–200 µM) (Kotturi et al. 2003), Verapamil und Diltiazem (1 mM) (Stokes et al. 2004) die Kalziumantwort über CD3. Des Weiteren interagiert STIM1 mit Ca_v1.2 und steuert die Aktivität von Ca_v1.2 und Orai1 reziprok (Park et al. 2010; Wang et al. 2010a). Über eine Herunterregulation von STIM1 konnte die Aktivität von Ca_v1.2 in Jurkat T-Zellen im Überexpressionssystem gezeigt werden (Park et al. 2010). Möglicherweise resultiert dieser Effekt jedoch aus dem veränderten STIM:Orai Verhältnis und aus der dadurch bedingten suboptimalen Aktivierung von Orai (Niemeyer & Hoth 2011)

In dieser Arbeit sollte untersucht werden ob spannungsgesteuerte L-Typ Kalzium Kanäle eine Rolle in der differentiellen Regulation der Kalziumsignale spielen und vielleicht ein STIM abhängiger Regulator der Kalziumantwort in Treg sind. Im ersten Schritt sollte geklärt werden, ob es in den CD4⁺ T-Zell Subtypen zu einem Kalziumeinstrom nach Depolarisation kommt. Die Depolarisation mit Hoch-Kalium Lösung (65 mM) bewirkte nur einen minimalen Anstieg der Kalziumkonzentration in Th0, Th1, Th2 und Treg (Abbildung 26). Wie bereits mehrfach in CD4⁺ Zellen untersucht, (Stokes et al. 2004; Badou et al. 2006; Park et al. 2010) ist es durch Depolarisation nicht möglich, eine Kalziumantwort in CD4⁺ T-Zell Subtypen auszulösen. Als nächstes wurde der Effekt der Ca_v1 Blocker Nicardipine, Nifedipine und Nimodipine auf das Kalziumplateau der CD4⁺ Effektor Gesamtpopulation untersucht um herauszufinden ob die Rolle von Ca_v1 in T-Zellen möglicherweise eher modulatorisch als direkt ist. Nicardipine und Nimodipine zeigten eine signifikante Reduktion des Kalziumsignals (Abbildung 28). Der Effekt war jedoch sehr gering (14,5 % bzw 5 % Reduktion).

Wahrscheinlicher ist es, dass dieser Effekt nicht durch die Inhibition der Ca_v1 Kanäle zustande kam, sondern durch die Unspezifität der verwendeten Blocker ausgelöst wurde.

Es ist gezeigt, dass Verapamil, Diltiazem und Nifedipine nicht spezifisch für Ca_v1 sind. In hohen Dosen, wie sie in den Studien verwendet wurden, werden auch Kalium Kanäle geblockt. Durch das Blocken der K^+ -Kanäle und die damit einhergehende Depolarisation der Membran, ändert sich der elektrische Gradient für Kalzium und der Kalziumeinstrom wird inhibiert, unabhängig von Ca_v -Kanal Aktivität (DeCoursey et al. 1985; Chandy et al. 2004; Hogan et al. 2010). Um zu untersuchen, ob die Effekte der Blocker auf einen bestimmten Subtyp über die Heterogenität der CD4^+ Effektor Gesamtpopulation maskiert werden, wurden Th1, Th2, Treg und die Kontrolle Th0 akut mit Nimodipine behandelt (Abbildung 27). Die akute Applikation auf das Kalziumplateau zeigte in Th1, Th2 und Treg eine signifikante Reduktion des Kalziumplateaus. Die Reduktion war aber mit maximal 5 % sehr gering. Auch hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Reduktion durch eine Inhibition der Kalium Kanäle und die damit zusammenhängende Änderung der Triebkraft für Kalzium zustande kommt.

In zwei Veröffentlichungen der Pelletier Gruppe wurde eine selektive Rolle von Ca_v1 in Th2 Zellen beschrieben (Robert et al. 2014; Cabral et al. 2010). Um sicherzugehen, dass die Inhibition der Kalziumantwort nicht nur durch einen bestimmten Blocker ausgelöst werden kann, wurde auf das Kalziumplateau von Th2 jeweils Nicardipine, Nifedipine und Nimodipine appliziert (Abbildung 29). Keiner der Blocker zeigte einen signifikanten Effekt auf die Thapsigargin-aktivierte Kalziumantwort in Th2 Zellen.

Insgesamt waren die im Ca^{2+} -readdition Protokoll gemessenen Effekte zu gering um die signifikanten Kalziumphänotypen über eine differentielle Rolle der Ca_v -Kanäle in den CD4^+ T-Zell Subtypen zu erklären.

In der Publikation der Pelletier Gruppe (Robert et al. 2014) wurde der Effekt der Ca_v1 Kanäle durch T-Zell Rezeptor vermittelte Aktivierung getestet. In Badou et al. (2006) wurde der Defekt in der Kalziumantwort der $\text{Ca}_v\beta3$ und $\text{Ca}_v\beta4$ defizienten T-Zellen nur über CD3 cross-linking gemessen. Bei der in dieser Arbeit gemessenen passiven Speicherentleerung durch Thapsigargin zeigte die Kalziumantwort kaum Unterschiede nach Ca_v1 Blocker Behandlung. Um zu untersuchen ob die Effekte der Ca_v1 Blocker möglicherweise nur bei einem, durch TCR-Aktivierung ausgelösten, Kalziumeinstrom messbar sind, wurde im nächsten Schritt der Kalziumeinstrom durch $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ Beads aktiviert. Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Nicardipine zeigte in Th2 und Th17 keine signifikanten Effekte auf die T-Zell Rezeptor vermittelte Kalziumantwort. In Th1 und Treg war die Reduktion zwar signifikant jedoch ebenfalls sehr klein und im mittleren zeitlichen Verlauf kaum sichtbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten im Zusammenhang mit bereits publizierten Daten im Kontrast zu Robert et al. (2014) dass eine Beteiligung der Ca_v1 Kanäle an der differentiellen Regulation der Kalziumphänotypen der CD4^+ T-Zell Subtypen unwahrscheinlich ist. Außerdem sind im Allgemeinen die spannungsgesteuerten Kalziumkanäle eher mit schnell wirkenden Abläufen wie Exocytose assoziiert. Veränderungen auf transkriptioneller Ebene benötigen Veränderungen der Kalziumkonzentration durch Kanäle, die über einen längeren Zeitraum aktiv bleiben, wie zum Beispiel Orai (Soboloff et al. 2012). Weitere Hinweise die gegen eine Beteiligung von Ca_v Kanälen am speichergesteuerten Kalziumeinstrom in CD4^+ T-Zell Subtypen sprechen, erhalten wir aus humanen Studien. *Loss-of-function* Mutationen der Ca_v1 resultieren nicht in einem immunologischen Defekt der Patienten. Einen zweiten Hinweis gibt der weit verbreitete Einsatz L-Typ Kalziumkanal Blocker als Medikament gegen kardiovaskuläre Erkrankungen. Dort sind bis jetzt keine Nebenwirkungen bekannt, die auf eine Beeinträchtigung der Immunfunktion hindeuten (Feske et al. 2012). Außerdem bleibt fraglich, wie die Interaktionsstudien der Ca_v Kanäle mit STIM1 (Park et al. 2010; Wang et al. 2010a) mit den Ergebnissen der Pelletier Gruppe (Robert et al. 2014) zusammen passen.

In den Publikationen aus 2010 wird beschrieben, dass STIM1 bei Aktivierung von SOCE $\text{Ca}_v1.2$ hemmt und Orai aktiviert. In der Pelletierstudie (Robert et al. 2014) ist SOCE in Th2 Zellen nach Inhibition von der $\text{Ca}_v1.2$ durch Nicardipine verkleinert. Auch hier ist STIM1 durch die Speicherentleerung nach T-Zellrezeptoraktivierung aktiv und sollte nach den Ergebnissen von Park und Wang (Park et al. 2010; Wang et al. 2010b) die $\text{Ca}_v1.2$ bereits unabhängig von Orai Aktivität inhibieren. Das wirft die Frage auf, wie ein bereits durch STIM1 gehemmter und damit inaktiver Kanal nach weiterer Inhibition mit einem Blocker eine Auswirkung auf SOCE hat. Dass die Inhibition von STIM1 auf Ca_v auch in Th2 stattfindet, konnte durch die Depolarisation mit einer Hoch-Kalium Lösung gezeigt werden (Abbildung 26). Die Applikation der Hoch-Kalium Lösung bewirkte in Th2 keinen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Überlegungen sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die durch hoch dosierte Ca_v Blocker gemessenen Effekte eher ein Resultat der unspezifischen Wirkung auf K^+ Kanäle sind.

Ein anderer Kandidat, der unabhängig von Orai1 den speichergesteuerten Kalziumeinstrom in Treg regulieren könnte, wäre ein Kanal aus der TRPC Familie, genauer TRPC3. Die mRNA Expression von TRPC3 steigt nach Aktivierung (Wenning et al. 2011). Es wurde außerdem gezeigt, dass TRPC3 zum Kalziumeinstrom nach T-Zell Rezeptor Aktivierung beiträgt (Philipp et al. 2003). Die Interaktion von TRPC Kanälen und STIM1 ist umstritten (Yuan et al. 2007; Dehaven et al. 2009). Einige der publizierten Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung von TRPC3 am speichergesteuerten Kalziumeinstrom, wobei diese Ergebnisse aus HEK Zellen, sowie naiven CD4^+ Zellen oder CD4^+ Effektor Gesamtpopulationen stammen. Möglicherweise sind die Effekte von TRPC3 aber Treg

spezifisch und deshalb durch die Heterogenität der Population maskiert. Beispielsweise führte die siRNA Behandlung von humanen CD4⁺ Zellen (*untouched*) zu sehr inkonsistenten Effekten. Je nach Spender war der Effekt von TRPC3 auf SOCE stärker oder schwächer ausgeprägt (Wenning et al. 2011, unpublizierte Daten). Im Mittelwert zeigte sich in CD4⁺ Zellen kein Effekt der siRNA gegen TRPC3 auf SOCE (Wenning et al. 2011). Vielleicht lassen sich diese Schwankungen durch die Spendervariabilität, bezüglich der Menge an regulatorischen T-Zellen erklären. Laut Schwarz et al. (2016) ruft die Spendervariabilität die größten Schwankungen in T-Zell Studien hervor. Bei CD4⁺ Zellen aus Spendern, die aufgrund ihres Gesundheitsstatus oder einer vorausgegangenen Infektion mehr Treg im Blut haben, könnte der Effekt von TRPC3 siRNA möglicherweise ausgeprägter sein als bei Spendern mit vergleichsweise wenigen Treg. Eine genauere Untersuchung von TRPC3 in Treg könnte deshalb zu einer Erklärung beitragen, warum Orai1 in Treg eine weniger prominente Rolle spielt (Diskutiert in 6.2.5) und die Herunterregulation des SOCE Inhibitors STIM2.1 keinen Effekt auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom hatte.

7.2.5 ROS Sensitivität der CD4⁺ T-Zell Subtypen

T-Zellen agieren während Entzündungsreaktionen in einem oxidativen Milieu. Dabei verursachen reaktive Sauerstoffspezies nicht nur oxidativen Stress, sondern dienen auch als *second messenger* (Droge & Dröge 2002; Reth 2002) und als chemotaktisches Signal (Niethammer et al. 2009). Außerdem beeinflussen reaktive Sauerstoffspezies den speichergesteuerten Kalziumeinstrom von T-Zellen durch die Oxidation von Orai1 an Cys¹⁹⁵. Diese Modifikation führt zu einer Reduktion von SOCE. Bei Orai3 fehlt dieses Cystein was in einer Resistenz gegenüber der ROS-Inhibition resultiert (Bogeski et al. 2010).

In dieser Arbeit wurden die *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen Th1 und Treg, sowie die Kontrolle Th0 mit einer der biologisch relevantesten reaktiven Sauerstoffspezies H₂O₂ behandelt (Droge & Dröge 2002). Dabei wurde die Auswirkung der Behandlung auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom mittels *Ca²⁺-Imaging* analysiert. Zur weiteren Charakterisierung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms von Th1 und Treg sollte geprüft werden, ob sich die Subtypen in ihrer Sensitivität gegenüber H₂O₂ unterscheiden. Einflussrate, Kalziumpeak und Plateau waren dabei in allen gemessenen CD4⁺ T-Zell Subtypen erniedrigt (Abbildung 32). Die Reduktion des speichergesteuerten Kalziumeinstroms lag dabei in allen Subtypen in einem ähnlichen Bereich (Tabelle 16). Insgesamt waren Th1 und Treg tendenziell weniger sensitiv als Th0 wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen jedoch sehr gering waren. Obwohl es Hinweise gibt, dass ROS die Polarisierung und Zytokin-Synthese in T-Helfer-Zellen beeinflusst (Abimannan et al.

2016), scheint die Sensitivität gegenüber der Inhibition von SOCE durch ROS nicht abzuweichen, zumindest nicht nach einem starken, nicht physiologischen Stimulus wie Thapsigargin. Dieses Ergebnis passt zu den Expressionsdaten von Orai3. Auf mRNA Ebene konnte kein signifikanter Unterschied in der Orai3 Expression festgestellt werden (Abbildung 18). Die Hochregulation des ROS-insensitiven Homologes Orai3 bewirkt eine geringere ROS Sensitivität des speichergesteuerten Kalziumeinstroms. Dadurch gewinnen Effektor T-Zellen im Laufe der Differenzierung eine immer größere Resistenz gegenüber der Inhibition durch H_2O_2 . Dieser Mechanismus ist eine mögliche Adaption an das oxidative Milieu in entzündlichem Gewebe um Zytokinproduktion und Proliferation aufrechterhalten zu können (Bogeski et al. 2010; Bogeski et al. 2012).

Unterschiedliche Tendenzen zwischen den Subtypen nach ROS-Behandlung waren während der Speicherentleerung durch Thapsigargin zu beobachten. Die Kontrollzellen Th0 zeigten eine Verkleinerung des Thapsigargin Peaks nach H_2O_2 Behandlung um 16 %. Th1 waren mit einer Vergrößerung um 0.7 % relativ unverändert, während Treg hingegen eine 8 % Erhöhung des Peaks nach passiver Speicherentleerung mit Thapsigargin zeigten (Tabelle 16 und Abbildung 32). Da bei der Zugabe von Thapsigargin kein Kalzium in der extrazellulären Lösung präsent war, kann diese unterschiedliche Reaktion auf den H_2O_2 Stimulus nicht auf den in Bogeski et al. (2010) beschriebenen *initial effect* zurück geführt werden. Dort führt die Applikation von H_2O_2 zu einer CRAC Kanal unabhängigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, vermutlich durch die Aktivierung von TRPM Kanälen. Aufgrund des fehlenden Ca^{2+} in der Perfusionslösung bei Zugabe von Thapsigargin kann der Unterschied in den Subtypen jedoch nicht von einem Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum herrühren. In den Experimenten dieser Arbeit resultierte die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aus der Entleerung der intrazelluläre Speicher. Es ist bekannt, dass H_2O_2 den IP_3 Rezeptor durch Oxidation aktiviert (Zheng & Shen 2005; Redondo et al. 2004; Kiselyov & Muallem 2016). In einer Studie von 2014 wurde gezeigt, dass in DT40 Zellen die Kalziumantwort nach Superoxid Behandlung anhängig von der IP_3 -Rezeptor (IP_3R) Isoform ist. IP_3R1 und IP_3R2 sind durch das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot -}$ aktivierbar, der IP_3R3 nicht (Bánsághi et al. 2014). Möglicherweise ist die Expression der IP_3 Rezeptor Isoformen unterschiedlich in den *in-vitro* polarisierten $CD4^+$ T-Zell Subtypen. Dies könnte in einer differentiellen Sensitivität auf die IP_3 -Rezeptor abhängige Aktivierung durch ROS und den daraus resultierenden unterschiedlichen Grad an Speicherentleerung und Erhöhung des zytosolischen Kalziums resultieren.

Interessant wäre zu untersuchen, ob der initiale Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch die akute Applikation von H_2O_2 in den $CD4^+$ T-Zell Subtypen unterschiedliche ausgeprägt ist. Dieser Effekt ist nicht von CRAC Kanälen getragen sondern

vermutlich von TRPM Kanälen (Bogeski et al. 2010). Dieses Experiment könnte einen Hinweis auf die differentielle Expression anderer Kation-Kanäle in CD4⁺ Subtypen geben.

7.3 Rolle von IL-21 in der Apoptosesensitivität der CD4⁺ T-Zellsubtypen

Das effektive Ausschalten der Immunantwort durch den programmierten Zelltod (Apoptose) der T-Helfer-Zellen ist essentiell um Gewebeschäden und Autoimmunität zu verhindern. Autoreaktive T-Helfer Zellen stehen im Zusammenhang mit Erkrankungen wie Multiple Sklerose, wobei hier bereits gezeigt wurde, dass in diesen die Apoptose verändert ist (Macchi et al. 1999; Sharief 2000; Achiron et al. 2007; Julià et al. 2009; Moreno et al. 2014). Die Untersuchung der Apoptose Sensitivität der *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen im Zusammenhang mit IL-21 könnte Hinweise auf die Entstehung dieser Effekte geben.

IL-21 beeinflusst viele Funktionen lymphoider Zellen auf pleiotrophe Art (Spolski & Leonard 2014). Die Datenlage zur Rolle von IL-21 in der Differenzierung von Th17 Zellen ist kontrovers. Zwar wurde gefunden, dass IL-21 die Th17 Polarisierung *in-vitro* fördert (Ivanov et al. 2007; Sonderegger et al. 2008), IL-21^{-/-} Mäuse zeigen jedoch eine normaler Th17 Differenzierung und unbeeinträchtigter Krankheitsverläufe bei experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (Coquet et al. 2008; Sonderegger et al. 2008). Trotzdem lässt die beobachtete Hochregulation von IL-21 in Autoimmunerkrankungen vermuten, dass IL-21 möglicherweise autoreaktive T-Zellen aktiviert (Peluso et al. 2007). Außerdem blockt IL-21 die Inhibition von CD4⁺CD25⁺ durch regulatorische CD4⁺CD25⁺ Zellen *in-vitro* (Peluso et al. 2007).

Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob IL-21 die Balance zwischen Apoptose und Proliferation beeinflusst. Dafür wurde untersucht, ob IL-21 von CD4⁺ Subtypen differentiell produziert wird (Abbildung 33). 72 % der Th1 Zellen und 24 % der Th17 produzierten IL-21. In Treg waren fast 15 % der Zellen positiv für IL-21, in Th2 4 %. Die relativen IL 21 mRNA Mengen waren ähnlich in den Verhältnissen zueinander. Es ist bekannt, dass hauptsächlich natürliche Killerzellen, T_{FH} Zellen und Th17 IL-21 produzieren (Spolski & Leonard 2014). Hier konnte festgestellt werden, dass alle Subtypen IL-21 produzieren. Der Anteil IL-21-produzierender Zellen war aber, je nach CD4⁺ T-Zell Subtyp, sehr unterschiedlich, was für eine differentielle Regulation durch dieses Zytokin spricht. Außerdem wurde überprüft, ob IL-21 die Produktion der Signaturzytokine und damit den Phänotyp beeinflusst (Abbildung 34). Diese waren durch die Inkubation mit IL-21 (12h, 100 ng/ml) in keinem Subtyp verändert.

Die Messung der spontanen und induzierten Apoptose sollte zeigen, ob die Apoptosesensitivität der Subtypen differentiell durch IL-21 beeinflusst wird. Möglicherweise könnten IL-21 produzierende Zellen durch die Sekretion von IL-21 die Sensitivität anderer Subtypen gegenüber apoptotischen Stimuli modulieren und dadurch die Balance innerhalb der Subtypen verändern. Die Inkubation sollte die Ausschüttung von IL-21 durch andere Zellen wie zum Beispiel Th1 nachahmen. Jedoch ließen sich weder in der Endpunktmessung durch Annexin V noch in der Kinetik der Caspase-3 abhängigen Apoptose Unterschiede nach IL-21 Behandlung feststellen (Abbildung 35). Keiner der *in-vitro* polarisierten Subtypen wurde in der Apoptosesensitivität von IL-21 beeinflusst. Dieses Ergebnis geht konform mit einem Ergebnissen aus Peluso et al. (2008). Dort wurde mittels Annexin V Färbung die Menge an apoptotischen, von CD4⁺CD25⁺ Zellen supprimierten, CD4⁺CD25⁻ Zellen gemessen. Auch hier beeinflusste IL-21 die Apoptose der CD4⁺CD25⁻ Zellen nicht. Damit scheint IL-21 weder in der spontanen noch in der induzierten Apoptose von *in-vitro* polarisierten CD4⁺ T-Zell Subtypen eine Rolle zu spielen. Obwohl also ein Unterschied in den IL-21 Leveln in Abhängigkeit des Subtyps gefunden wurde, konnte der Mechanismus auf den durch IL-21 Einfluss genommen wird, nicht gefunden werden. Jedoch konnte sowohl ausgeschlossen werden, dass IL-21 einen Einfluss auf die *in-vitro* Polarisierung hat, als auch bestätigt werden, dass sich IL-21 nicht auf die Apoptosesensitivität dieser Zellen auswirkt.

Zusätzlich zu der Rolle von IL-21 in der Apoptosesensitivität der CD4⁺ T-Zell Subtypen wurde auch die Sensitivität der unbehandelten CD4⁺ Subtypen gegenüber spontaner sowie induzierter Apoptose verglichen. Dabei war zu beobachten, dass Th1 und Treg die höchste spontane Apoptoserate unter den CD4⁺ Subtypen zeigen (Abbildung 35A). Bei induzierter Apoptose durch Staurosporin zeigten Th1 den größten Anteil apoptotischer Zellen (Abbildung 35B). In Cencioni et al. (2015) wurde beschrieben, dass Th1 sensibler gegenüber AICD (Activation induced cell death) sind, und dass diese Sensitivität vermutlich über die Hochregulation des FasL vermittelt wird. Außerdem ist bekannt, dass AICD im Zusammenhang mit Orai1 steht (Kim et al. 2011). In Orai1^{-/-} T-Zellen wurde eine Resistenz gegen AICD festgestellt. Diese Resistenz ist unter anderem mit einer geringeren Expression des FasL assoziiert. Die Ergebnisse von Kim et al. (2011) weisen darauf hin, dass der Grad an AICD direkt proportional zu dem durch Orai1 regulierten Kalzium Level ist. Diese Theorie könnte durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Th1 zeigte abgesehen von Treg den größten Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung mit Thapsigargin (Abbildung 11). Dieser wurde durch siRNA Behandlung gegen Orai1 erniedrigt. Treg zeigten eine Erhöhung von SOCE nach siRNA Behandlung gegen Orai1 (Abbildung 25). Dieses Ergebnis weist wie in 7.2.3 diskutiert darauf hin, dass der speichergesteuerte Kalziumeinstrom von Treg über STIM jedoch unabhängig von Orai1 vermittelt werden könnte. Mehrere Untersuchungen

zeigten, dass der T-Zell spezifische *knockout* von Orai1 keine Auswirkung auf die FoxP3 Produktion hat (Gwack et al. 2008; Kim et al. 2013; Kaufmann et al. 2015), welche jedoch abhängig von NFAT (Müller & Rao 2010; Tone et al. 2008; Y. Wu et al. 2006) und STIM1 ist (Desvignes et al. 2015).

Damit hätten Th1 den größten Orai1-abhängigen speichergesteuerten Kalziumeinstrom und wären demzufolge sensibler für AICD als Th2 und Th17, die geringere Kalziumlevel nach Aktivierung zeigten (Abbildung 17). Treg zeigten zwar in der spontanen Apoptose ebenfalls eine verstärkte Apoptose verglichen mit Th2 und Th17, jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass diese durch den stärkeren Aktivierungsstimulus ausgelöst wurde. Th1 und Treg wurden mit einer Bead:Zell Ratio von 1:10 stimuliert, Th2 und Th17 dagegen mit einer Ratio von 1:20 bzw. 1:50. Bei induzierter Apoptose war die Sensitivität von Treg gegenüber dem apoptotischen Stimulus geringer als in Th1. Durch die Vermutung, dass die Kalziumantwort in Treg zwar über STIM, nicht aber über Orai1 vermittelt sein könnte, könnte erklärt werden warum Treg trotz des hohen Kalziumeinstroms keine verstärkte Orai1 vermittelte Apoptose zeigten.

8 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die *in-vitro* Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zell Subtypen erfolgreich zu etablieren und zu optimieren. Die T-Helfer Subtypen Th1, Th2 und die regulatorischen T-Zellen zeigten nach Polarisierung eine signifikante und spezifische Produktion ihres jeweiligen Signaturzytokins. Auch Th17 produzierten signifikant mehr IL-17 als die Kontrollzellen Th0; wiesen jedoch eine relative hohe Spendervariabilität auf. Zudem könnte die Menge an IL-17 produzierenden Zellen noch weiter optimiert werden. Derzeit wird in der Arbeitsgruppe an weiteren Optimierungsmöglichkeiten gearbeitet, wie beispielsweise die Verwendung von Memory T-Zellen als Ausgangsmaterial im Vergleich zu naiven T-Zellen, da aktuelle Literatur darauf hinweist, dass die Polarisierungseffizienz in die verschiedenen Subtypen davon beeinflusst wird.

Alle CD4⁺ T-Zell Subtypen wiesen charakteristische und signifikante Kalziumphänotypen auf. Diese werden möglicherweise von der neu gefundenen inhibitorischen Spleißvariante STIM2.1 und dem CRAC Kanal Orai1 differentiell beeinflusst. Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der Effekt von Orai und STIM2.1 möglicherweise kein ubiquitärer Effekt, sondern ein zellspezifischer sein könnte und sich in den Subtypen grundlegend unterscheidet.

Aus diesem Grund, wäre eine genauere Betrachtung der Faktoren welche an der Entstehung der Kalziumphänotypen beteiligt sein könnten interessant. Zum einen sollten die relativen Proteinmengen von Orai2 und Orai3 in den Subtypen genauer untersucht werden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Kalzium-abhängigen Inaktivierung könnten die Homologe einen wichtigen Einfluss in der differentiellen Regulation der Kalziumprofile spielen. Die Entwicklung spezifischer Antikörper könnte hier weiterhelfen.

Des Weiteren könnten über ein mRNA Mikroarray, mögliche Regulatoren der Kalziumsignale in den CD4⁺ T-Zell Subtypen identifiziert werden. Hierbei würden auch andere Kanäle wie TRP Kanäle oder posttranskriptionale Regulatoren wie Kinasen mit eingeschlossen. Letztere könnten dabei helfen die Diskrepanzen zwischen α CD3/ α CD28 Bead Stimulation und Stimulation über passive Speicherentleerung mittels Thapsigargin zu erklären.

Ein wichtiger Schritt für potentielle klinische Anwendungen wäre der Vergleich der Kalziumprofile von CD4⁺ T-Zell Subtypen aus Patienten mit Multiple Sklerose oder anderen chronisch entzündlicher Erkrankungen, die mit einer Fehlregulation der Subtypen assoziiert sind. Möglicherweise beeinflussen diese Kalziumsignale die Pathogenität und somit auch die Balance bestimmter Subtypen, was die Regulatoren dieser differentiellen Profile zu einem interessanten Ansatzpunkt für Therapeutika machen könnte

Literaturverzeichnis

- Abimannan, T., Peroumal, D., Parida, J.R., Barik, P.K., Padhan, P. & Devadas, S., 2016. Oxidative stress modulates the cytokine response of differentiated Th17 and Th1 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 99, pp.352–363.
- Achiron, A., Feldman, A., Mandel, M. & Gurevich, M., 2007. Impaired expression of peripheral blood apoptotic-related gene transcripts in acute multiple sclerosis relapse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1107, pp.155–167.
- Acosta-Rodriguez, E. V, Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F., 2007. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17–producing human T helper cells. *Nature Immunology*, 8, pp.942–949.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., De Sauvage, F.J. & Gurney, A.L., 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp.1910–1914.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M. & Akdis, C.A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127, pp.701-21-70.
- Alansary, D., Schmidt, B., Dörr, K., Bogeski, I., Rieger, H., Kless, A. & Niemeyer, B.A., 2016. Thiol dependent intramolecular locking of Orai1 channels. *Scientific Reports*, 6, p.33347.
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S., 1996. Autoimmune Disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine*, 184, pp.387–396.
- Athie-Morales, V., Smits, H.H., Cantrell, D.A. & Hilkens, C.M.U., 2004. Sustained IL-12 Signaling Is Required for Th1 Development. *The Journal of Immunology*, 172, pp.61–69.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M. & Kurosaki, T., 2006. Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp.16704–9.
- Badou, A., Jha, M.K., Matza, D., Mehal, W.Z., Freichel, M., Flockerzi, V. & Flavell, R. a, 2006. Critical role for the beta regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

-
- America*, 103, pp.15529–34.
- Badou, A., Savignac, M., Moreau, M., Leclerc, C., Foucras, G., Cassar, G., Paulet, P., Lagrange, D., Druet, P., Guéry, J.C. & Pelletier, L., 2001. Weak TCR stimulation induces a calcium signal that triggers IL-4 synthesis, stronger TCR stimulation induces MAP kinases that control IFN- γ production. *European Journal of Immunology*, 31, pp.2487–2496.
- Bánsághi, S., Golenár, T., Madesh, M., Csordás, G., Ramachandra Rao, S., Sharma, K., Yule, D.I., Joseph, S.K. & Hajnóczy, G., 2014. Isoform- and species-specific control of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors by reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 289, pp.8170–8181.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F. & Ochs, H.D., 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*, 27, pp.20–1.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. & Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), pp.235–238.
- Bilate, A.B. & Lafaille, J.J., 2011. It takes two to tango. *Immunity*, 35, pp.6–8.
- Bird, G.S., Hwang, S.Y., Smyth, J.T., Fukushima, M., Boyles, R.R. & Putney, J.W., 2009. STIM1 Is a Calcium Sensor Specialized for Digital Signaling. *Current Biology*, 19, pp.1724–1729.
- Bogeski, I., Kilch, T. & Niemeyer, B.A., 2012. ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *The Journal of Physiology*, 590, pp.4193–200.
- Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E.C., Koehler, R., Kozai, D., Takahashi, N., Peinelt, C., Griesemer, D., Bozem, M., Mori, Y., Hoth, M. & Niemeyer, B.A., 2010. Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Science signaling*, 3, p.ra24.
- Bondensgaard, K., Breinholt, J., Madsen, D., Omkvist, D.H., Kang, L., Worsaae, A., Becker, P., Schiødt, C.B. & Hjorth, S.A., 2007. The existence of multiple conformers of interleukin-21 directs engineering of a superpotent analogue. *Journal of Biological Chemistry*, 282, pp.23326–23336.
- Bottomly, K., 1988. A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes. *Immunology Today*, 9, pp.268–274.
- Bradley, L.M., Watson, S.R. & Swain, S.L., 1994. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *Journal of Experimental Medicine*, 180, pp.2401–2406.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W.S. & Meyer, T., 2007. STIM2 Is a Feedback Regulator that

-
- Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Levels. *Cell*, 131, pp.1327–1339.
- Brandt, K., Bulfone-Paus, S., Foster, D.C. & Rückert, R., 2003. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood*, 102, pp.4090–4098.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepers, B., Clark, L.B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F. & Ramsdell, F., 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, 27, pp.68–73.
- Bucher, C., Koch, L., Vogtenhuber, C., Goren, E., Munger, M., Panoskaltsis-Mortari, A., Sivakumar, P. & Blazar, B.R., 2009. IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation. *Blood*, 114, pp.5375–5384.
- Cabral, M.D., Paulet, P.E., Robert, V., Gomes, B., Renoud, M.L., Savignac, M., Leclerc, C., Moreau, M., Lair, D., Langelot, M., Magnan, A., Yssel, H., Mariamé, B., Guéry, J.C. & Pelletier, L., 2010. Knocking down Cav1 calcium channels implicated in Th2 cell activation prevents experimental asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181, pp.1310–1317.
- Cencioni, M.T., Santini, S., Ruocco, G., Borsellino, G., De Bardi, M., Grasso, M.G., Ruggieri, S., Gasperini, C., Centonze, D., Barilá, D., Battistini, L. & Volpe, E., 2015. FAS-ligand regulates differential activation-induced cell death of human T-helper 1 and 17 cells in healthy donors and multiple sclerosis patients. *Cell Death and Disease*, 6, p.e1741.
- Chandy, K.G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G.A. & Cahalan, M.D., 2004. K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, pp.280–289.
- Chatila, T.A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H.M., Voulgaropoulos, C., Helms, C. & Bowcock, A.M., 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 106, pp.75–81.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S.M., 2003. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25[–] naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*, 198(12), pp.1875–1886.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium Signaling. *Cell*, 131, pp.1047–1058.
- Clement, L.T., 1992. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *Journal of clinical immunology*, 12, pp.1–10.
- Comi, C., Fleetwood, T. & Diansani, U., 2012. The role of T cell apoptosis in nervous system autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 12, pp.150–156.

-
- Constant, S.L. & Bottomly, K., 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annual review of immunology*, 15, pp.297–322.
- Coquet, J.M., Chakravarti, S., Smyth, M.J. & Godfrey, D.I., 2008. Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*, 180, pp.7097–101.
- DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S. & Cahalan, M.D., 1985. Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 10, pp.71–95.
- Dehaven, W.I., Jones, B.F., Petranka, J.G., Smyth, J.T., Tomita, T., Bird, G.S. & Putney, J.W., 2009. TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *Journal of Physiology*, 58710, pp.2275–2298.
- Deng, X., Wang, Y., Zhou, Y., Soboloff, J. & Gill, D.L., 2009. STIM and Orai: Dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp.22501–22505.
- Desvignes, L., Weidinger, C., Shaw, P., Vaeth, M., Ribierre, T., Liu, M., Fergus, T., Kozhaya, L., Mcvoy, L., Unutmaz, D., Ernst, J.D. & Feske, S., 2015. STIM1 controls T cell – mediated immune regulation and inflammation in chronic infection. *The Journal of clinical investigation*, 125, pp.16–18.
- Di, L., Srivastava, S., Zhdanova, O., Ding, Y., Li, Z., Wulff, H., Lafaille, M. & Skolnik, E.Y., 2010. Inhibition of the K⁺ channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, pp.1541–6.
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. & Healy, J.I., 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, 386, pp.855–858.
- Droge, W. & Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, pp.47–95.
- Fanger, C.M., Neben, A.L. & Cahalan, M.D., 2000. Differential Ca²⁺ influx, KCa channel activity, and Ca²⁺ clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *Journal of immunology*, 164, pp.1153–1160.
- Feske, S., Giltzane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L.M. & Rao, A., 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature Immunology*, 2, pp.316–324.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M. & Rao, A., 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441, pp.179–185.
- Feske, S., Skolnik, E.Y. & Prakriya, M., 2012. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 12, pp.532–547.
- Fitch, F.W., Gajewski, T.F. & Hu-Li, J., 2006. Production of Th1 and Th2 cell lines and

-
- clones. *Curr Protocols in Immunology*, Chapter 3, p.Unit 3.13.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. & Huehn, J., 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biology*, 5, pp.0169–0178.
- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E. & Lipp, M., 1999. CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell*, 99, pp.23–33.
- Frischauf, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Fritsch, R., Lackner, B., Groschner, K. & Romanin, C., 2011. Cooperativeness of Orai cytosolic domains tunes subtype-specific gating. *Journal of Biological Chemistry*, 286, pp.8577–8584.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y. & Bromberg, J.S., 2004. TGF- β induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *American Journal of Transplantation*, 4, pp.1614–1627.
- Fuchs, S., Rensing-Ehl, A., Speckmann, C., et al., 2012. Antiviral and Regulatory T Cell Immunity in a Patient with Stromal Interaction Molecule 1 Deficiency. *The Journal of Immunology*, 188, pp.1523–1533.
- Ganjalikhani Hakemi, M., Ghaedi, K., Andalib, A., Hosseini, M. & Rezaei, A., 2011. Optimization of human Th17 cell differentiation in vitro: Evaluating different polarizing factors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 47, pp.581–592.
- Geginat, J., Paroni, M., Facciotti, F., Gruarin, P., Kastirr, I., Caprioli, F., Pagani, M. & Abrignani, S., 2013. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Seminars in Immunology*, 25, pp.252–262.
- Germain, R.N., 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology*, 2, pp.309–322.
- Ghaedi, M., Namdari, H., Rahimzadeh, P., Morteza Gholi, S., Azimi Mohamadabadi, M. & Salehi, E., 2015. Different Doses of Transforming growth factor-beta on In vitro Differentiation of Human Naive CD4+ T Cells to T Helper 17. *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology*, 14, pp.633–637.
- Gharibi, T., Majidi, J., Kazemi, T., Dehghanzadeh, R., Motalebnezhad, M. & Babaloo, Z., 2016. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology*, 221, pp.357–367.
- Gocke, A.R., Cravens, P.D., Ben, L.-H., Hussain, R.Z., Northrop, S.C., Racke, M.K. & Lovett-Racke, A.E., 2007. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *Journal of Immunology*, 178, pp.1341–1348.
- Le Gros, G., Ben-sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D. & Paul, W.E., 1990. Generation of

-
- Interleukin 4 (IL-4)-producing Cells In Vivo and In Vitro: IL-2 and IL-4 Are Required For In Vitro Generation of IL-4-producing Cells. *The Journal of experimental medicine*, 172, pp.921–929.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260, pp.3440–3450.
- Guo, L., Hu-Li, J. & Paul, W.E., 2005. Probabilistic regulation of IL-4 production. *Journal of Clinical Immunology*, 25, pp.573–581.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D.S., Hogan, P.G. & Rao, A., 2007. Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282, pp.16232–16243.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P.G., Lamperti, E.D., Yamashita, M., Gelinas, C., Neems, D.S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K. & Rao, A., 2008. Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Molecular and cellular biology*, 28, pp.5209–5222.
- Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., et al., 2011. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*, 35, pp.109–122.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. & Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*, 6, pp.1123–1132.
- Helmstetter, C., Flossdorf, M., Peine, M., Kupz, A., Zhu, J., Hegazy, A.N., Duque-Correa, M.A., Zhang, Q., Vainshtein, Y., Radbruch, A., Kaufmann, S.H., Paul, W.E., Höfer, T. & Löhning, M., 2015. Individual T Helper Cells Have a Quantitative Cytokine Memory. *Immunity*, 42, pp.108–122.
- Hermiston, M.L., Xu, Z. & Weiss, A., 2003. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annual Review of Immunology*, 21, pp.107–37.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A., 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes and Development*, 17, pp.2205–2232.
- Hogan, P.G., Lewis, R.S. & Rao, A., 2010. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual Review of Immunology*, 28, pp.537–545.
- Hoover, P.J. & Lewis, R.S., 2011. Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, pp.13299–13304.
- Hoth, M. & Penner, R., 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355, pp.353–356. Available at: [Accessed October 18,

-
- 2016].
- Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A. & Murphy, K.M., 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, pp.6065–6069.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. & Murphy, K.M., 1993. Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260, pp.547–549.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. & Littman, D.R., 2006. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell*, 126, pp.1121–1133.
- Ivanov, I.I., Zhou, L. & Littman, D.R., 2007. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Seminars in Immunology*, 19, pp.409–417.
- Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. a, Bettelli, E. & Kuchroo, V.K., 2009. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of Immunology*, 183, pp.7169–7177.
- Janeway, C.A. & Medzhitov, R., 2002. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, pp.197–216.
- Jin, H., Carrio, R., Yu, A. & Malek, T.R., 2004. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol*, 173, pp.657–665.
- Julia, E., Edo, M.C., Horga, A., Montalban, X. & Comabella, M., 2009. Differential susceptibility to apoptosis of CD4⁺T cells expressing CCR5 and CXCR3 in patients with MS. *Clinical Immunology*, 133, pp.364–374.
- Kar, P., Bakowski, D., Di Capite, J., Nelson, C. & Parekh, A.B., 2012. Different agonists recruit different stromal interaction molecule proteins to support cytoplasmic Ca²⁺ oscillations and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, pp.6969–6974.
- Kar, P. & Parekh, A.B., 2015. Distinct Spatial Ca²⁺ Signatures Selectively Activate Different NFAT Transcription Factor Isoforms. *Molecular Cell*, 58(2), pp.232–243.
- Kaufmann, U., Shaw, P.J., Kozhaya, L., Subramanian, R., Gaida, K., Unutmaz, D., McBride, H.J. & Feske, S., 2015. Selective ORA1 Inhibition Ameliorates Autoimmune Central Nervous System Inflammation by Suppressing Effector but Not Regulatory T Cell Function. *The Journal of Immunology*, 196, pp.573–585.
- Kawasaki, T., Lange, I. & Feske, S., 2009. A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORA1 CRAC channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385, pp.49–54.

-
- Kilch, T., Alansary, D., Peglow, M., Dörr, K., Rychkov, G., Rieger, H., Peinelt, C. & Niemeyer, B.A., 2013. Mutations of the Ca²⁺-sensing Stromal Interaction Molecule STIM1 regulate Ca²⁺ Influx by Altered Oligomerization of STIM1 and by Destabilization of the Ca²⁺ channel Orai1. *Journal of Biological Chemistry*, 288, pp.1653–1664.
- Kim, K.-D., Srikanth, S., Tan, Y.-V., Yee, M.-K., Jew, M., Damoiseaux, R., Jung, M.E., Shimizu, S., An, D.S., Ribalet, B., Waschek, J. a & Gwack, Y., 2013. Calcium Signaling via Orai1 Is Essential for Induction of the Nuclear Orphan Receptor Pathway To Drive Th17 Differentiation. *Journal of Immunology*, 192, pp.110–122.
- Kim, K.-D., Srikanth, S., Yee, M.-K.W., Mock, D.C., Lawson, G.W. & Gwack, Y., 2011. ORAI1 Deficiency Impairs Activated T Cell Death and Enhances T Cell Survival. *Journal of Immunology*, 187, pp.3620–3630.
- Kiselyov, K. & Muallem, S., 2016. ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium*, 60, pp.108–114.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M. & Kuchroo, V.K., 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells. *Nature*, 448, pp.484–487.
- Kotturi, M.F., Carlow, D.A., Lee, J.C., Ziltener, H.J. & Jefferies, W.A., 2003. Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, pp.46949–46960.
- Lacruz, R.S. & Feske, S., 2015. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1356, pp.45–79.
- Lantelme, E., Mantovani, S., Palermo R Campanelli, B., Sallusto, F. & Giachino, C., 2001. Kinetics of GATA-3 gene expression in early polarizing and committed human T cells. *Immunology*, 102, pp.123–130.
- Lee, K.P., Yuan, J.P., Zeng, W., So, I., Worley, P.F. & Muallem, S., 2009. Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, pp.14687–14692.
- Leitenberg, D. & Bottomly, K., 1999. Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Seminars in Immunology*, 11, pp.283–292.
- Lewis, R.S., 2001. Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 19, pp.497–521.
- Lewis, R.S., 2007. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*, 446, pp.284–287.
- Li, Z., Liu, L., Deng, Y., Ji, W., Du, W., Xu, P., Chen, L. & Xu, T., 2011. Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell Research*, 21, pp.305–315.

-
- Liou, J., Kim, M.L., Won, D.H., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E. & Meyer, T., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store- depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology*, 15, pp.1235–1241.
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A. & Penner, R., 2007. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are Store-Operated Ca²⁺ Channels with Distinct Functional Properties. *Current Biology*, 17, pp.794–800.
- Liu, W., Li, H., Zhang, X., Wen, D., Yu, F., Yang, S., Jia, X., Cong, B. & Ma, C., 2013. Prostaglandin I₂-IP signalling regulates human Th17 and Treg cell differentiation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89, pp.335–344.
- Lytton, J., Westlin, M. & Hanley, M.R., 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 266, pp.17067–17071.
- Ma, D., Wei, Y. & Liu, F., 2013. Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Developmental & Comparative Immunology*, 39, pp.91–102.
- Ma, J., McCarl, C.-A., Khalil, S., Lüthy, K. & Feske, S., 2010. T-cell specific deletion of STIM1 and STIM2 protects mice from ESE by impairing the effector functions of Th1 and Th17 cells. *European Journal of Immunology*, 40, pp.3028–3042.
- Macchi, B., Matteucci, C., Nocentini, U., Caltagirone, C. & Mastino, A., 1999. Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *NeuroReport*, 10, pp.399–402.
- Macián, F., García-Cózar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C. & Rao, A., 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell*, 109, pp.719–731.
- Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D.R., 2008. The differentiation of human Th-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nature Immunology*, 9, pp.641–649.
- Marshall, C.B., Nishikawa, T., Osawa, M., Stathopoulos, P.B. & Ikura, M., 2015. Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460, pp.5–21.
- Mehta, D.S., Wurster, A.L., Whitters, M.J., Young, D.A., Collins, M. & Grusby, M.J., 2003. IL-21 Induces the Apoptosis of Resting and Activated Primary B Cells. *J Immunol References*, 170, pp.4111–4118.
- Mercer, J.C., DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Wedel, B., Boyles, R.R., Bird, G.S. & Putney, J.W., 2006. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp.24979–24990.
- Miederer, A.-M., Alansary, D., Schwär, G., Lee, P.-H., Jung, M., Helms, V. & Niemeyer, B.A., 2015. A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nature*

Communications, 6, p.6899.

- Moreno, M., Negrotto, L., Río, J., Moubarak, R., Martín, I., Bustamante, M.F., Comella, J.X., Vidal-Jordana, A., Pérez-Boza, J., Montalban, X. & Comabella, M., 2014. Activation-induced cell death in T lymphocytes from multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 272, pp.51–55.
- Mosmann, T. & Coffman, R., 1987. Two Types of Mouse Helper T Cell Clone. *Immunology Today*, 8, pp.223–227.
- Müller, M.R. & Rao, A., 2010. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 10, pp.645–656.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M., 2009. *Janeway Immunologie* 7. Auflage., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Neumann, J., 2008. *Immunbiologie*, Springer Verlag.
- Niemeyer, B.A. & Hoth, M., 2011. Excitable T Cells: CaV1.4 Channel Contributions and Controversies. *Immunity*, 35, pp.315–317.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T. & Mitchison, T.J., 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, 459, pp.996–999.
- Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M. & Dong, C., 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448, pp.480–483.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P.G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S. & Rao, A., 2008. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*, 9, pp.432–443.
- Omilusik, K., Priatel, J.J., Chen, X., Wang, Y.T., Xu, H., Choi, K.B., Gopaul, R., McIntyre-Smith, A., Teh, H.S., Tan, R., Bech-Hansen, N.T., Waterfield, D., Fedida, D., Hunt, S. V. & Jefferies, W.A., 2011. The CaV1.4 Calcium Channel Is a Critical Regulator of T Cell Receptor Signaling and Naive T Cell Homeostasis. *Immunity*, 35, pp.349–360.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.-F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., Liu, C., Schwartzberg, P.L. & Leonard, W.J., 2002. A Critical Role for IL-21 in Regulating Immunoglobulin Production. *Science*, 298, pp.1630–1634.
- Van Panhuys, N., Klauschen, F. & Germain, R.N., 2014. T-Cell-Receptor-Dependent Signal Intensity Dominantly Controls CD4+ T Cell Polarization In-Vivo. *Immunity*, 41, pp.63–74.
- Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E. & Lewis, R.S., 2009. STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell*, 136, pp.876–890.

-
- Park, C.Y., Shcheglovitov, A. & Dolmetsch, R., 2010. The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*, 330, pp.101–105.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. & Dong, C., 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6, pp.1133–1141.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., et al., 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 408, pp.57–63.
- Dos Passos, G.R., Sato, D.K., Becker, J. & Fujihara, K., 2016. Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Mediators of Inflammation*, 2016, pp.1–11.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D.L., Beck, A., Nadler, M.J.S., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R. & Kinet, J.-P., 2006. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nature cell biology*, 8, pp.771–773.
- Philipp, S., Strauss, B., Hirnet, D., Wissenbach, U., Méry, L., Flockerzi, V. & Hoth, M., 2003. TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp.26629–26638.
- Picard, C., McCarl, C.-A., Papolos, A., Khalil, S., Lüthy, K., Hivroz, C., Ledeist, F., Rieux-laucat, F., Rechavi, G., Rao, A., Fischer, A. & Feske, S., 2009. STIM1 Mutation Associated with a Syndrome of Immunodeficiency and Autoimmunity. *The New England Journal of Medicine*, 360, pp.1971–1980.
- Prakriya, M. & Lewis, R.S., 2015. Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 95, pp.1383–1436.
- Purvis, H. a., Stoop, J.N., Mann, J., Woods, S., Kozijn, A.E., Hambleton, S., Robinson, J.H., Isaacs, J.D., Anderson, A.E. & Hilkens, C.M.U., 2010. Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood*, 116, pp.4829–4837.
- Putney, J.W., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium*, 7, pp.1–12.
- Qu, B., Al-Ansary, D., Kummerow, C., Hoth, M. & Schwarz, E.C., 2011. ORAI-mediated calcium influx in T cell proliferation, apoptosis and tolerance. *Cell Calcium*, 50, pp.261–269.
- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A.M., Malmersjö, S., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E. & Lewis, R.S., 2015. Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *Journal of Cell Biology*, 209, pp.653–670.
- Rand, U., Rinas, M., Schwerk, J., Nöhren, G., Linnes, M., Kröger, A., Flossdorf, M., Kály-Kullai, K., Hauser, H., Höfer, T. & Köster, M., 2012. Multi-layered stochasticity and paracrine signal propagation shape the type-I interferon response. *Molecular systems biology*, 8, p.584.

-
- Rao, A. & Hogan, P.G., 2009. Calcium signaling in cells of the immune and hematopoietic systems. *Immunological Reviews*, 231, pp.5–9.
- Redondo, P.C., Salido, G.M., Rosado, J.A. & Pariente, J.A., 2004. Effect of hydrogen peroxide on Ca²⁺ mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 67, pp.491–502.
- Reth, M., 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol*, 3(12), pp.1129–1134.
- Robert, V., Triffaux, E., Paulet, P.E., Guéry, J.C., Pelletier, L. & Savignac, M., 2014. Protein kinase C-dependent activation of CaV1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133, pp.1175–1183.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Velicelebi, G. & Stauderman, K.A., 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *Journal of Cell Biology*, 169, pp.435–445.
- Rosenblum, M.D., Way, S.S. & Abbas, A.K., 2015. Regulatory T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16, pp.90–101.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J of Immunology*, 155, pp.1151–1164.
- Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A., 2004. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22, pp.745–763.
- Schmitt, E.G. & Williams, C.B., 2013. Generation and function of induced regulatory T cells. *Frontiers in Immunology*, 4, pp.1–13.
- Schuhmann, M.K., Stegner, D., Berna-Ero, A., Bittner, S., Braun, A., Kleinschnitz, C., Stoll, G., Wiendl, H., Meuth, S.G. & Nieswandt, B., 2010. Stromal interaction molecules 1 and 2 are key regulators of autoreactive T cell activation in murine autoimmune central nervous system inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184, pp.1536–1542.
- Schwarz, E.C., Backes, C., Knörck, A., et al., 2016. Deep characterization of blood cell miRNomes by NGS. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, pp.3169–3181.
- Scrimgeour, N., Litjens, T., Ma, L., Barritt, G.J. & Rychkov, G.Y., 2009. Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins. *The Journal of Physiology*, 587, pp.2903–2918.
- Seder, R. a, Paul, W.E., Davis, M.M. & Fazekas de St Groth, B., 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of

-
- CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 176, pp.1091–1098.
- Sekiya, T., Nakatsukasa, H., Lu, Q. & Yoshimura, A., 2016. Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells. *Microbes and Infection*, 18, pp.378–386.
- Sekiya, T. & Yoshimura, A., 2016. *TGF- β Signaling Methods and Protocols: In Vitro Th Differentiation Protocol*,
- Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G., et al., 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, pp.3507–3512.
- Serfling, E., Avots, A., Klein-Hessling, S., Rudolf, R., Vaeth, M. & Berberich-Siebelt, F., 2012. NFATc1/ α A: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. *Cell Commun Signal*, 10, pp.16–26.
- Sharief, M., 2000. Impaired Fas-independent apoptosis of T lymphocytes in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 109, pp.236–243.
- Sie, C., Korn, T. & Mitsdoerffer, M., 2014. Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Experimental Neurology*, 262, pp.18–27.
- Soboloff, J., Madesh, M. & Donald, G.L., 2011. Sensing cellular stress through STIM proteins. *Nature Chemical Biology*, 7, pp.488–492.
- Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M. & Gill, D.L., 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, pp.549–565.
- Soboloff, J., Spassova, M.A., Hewavitharana, T., He, L.P., Xu, W., Johnstone, L.S., Dziadek, M.A. & Gill, D.L., 2006. STIM2 Is an Inhibitor of STIM1-Mediated Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Current Biology*, 16, pp.1465–1470.
- Soboloff, J., Spassova, M.A., Tang, X.D., Hewavitharana, T., Xu, W. & Gill, D.L., 2006. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp.20661–20665.
- Sonderegger, I., Kisielow, J., Meier, R., King, C. & Kopf, M., 2008. IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *European Journal of Immunology*, 38, pp.1833–1838.
- Spolski, R., Kim, H.-P., Zhu, W., Levy, D.E. & Leonard, W.J., 2009. IL-21 mediates suppressive effects via its induction of IL-10. *Journal of Immunology*, 182, pp.2859–67.
- Spolski, R. & Leonard, W.J., 2014. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery*, 13, pp.379–395.
- Stephens, L.A., Mottet, C., Mason, D. & Powrie, F., 2001. Human CD4⁺CD25⁺ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *European Journal of Immunology*, 31, pp.1247–1254.

-
- Stockinger, B., 2007. Good for Goose, but Not for Gander: IL-2 Interferes with Th17 Differentiation. *Immunity*, 26, pp.278–279.
- Stokes, L., Gordon, J. & Grafton, G., 2004. Non-voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in human T cells: Pharmacology and molecular characterization of the major α pore-forming and auxiliary β -subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 279, pp.19566–19573.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G. & Huston, G., 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology*, 145, pp.3796–3806.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G. & Glimcher, L.H., 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100, pp.655–669.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. & Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, pp.231–241.
- Thompson, J.L. & Shuttleworth, T.J., 2013. How many Orai's does it take to make a CRAC channel? *Scientific reports*, 3, p.1961.
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I. & Tone, M., 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature Immunology*, 9, pp.194–202.
- Tsien, R.W., Hess, P., McCleskey, E.W. & Rosenberg, R.L., 1987. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 16, pp.265–290.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. & Stockinger, B., 2006. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24, pp.179–189.
- Vig, M., DeHaven, W.I., Bird, G.S., Billingsley, J.M., Wang, H., Rao, P.E., Hutchings, A.B., Jouvin, M.-H., Putney, J.W. & Kinet, J.-P., 2008. Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nature immunology*, 9, pp.89–96.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. & Kinet, J.-P., 2006. CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science*, 312, pp.1220–1223.
- Volpe, E., Battistini, L. & Borsellino, G., 2015. Advances in T helper 17 cell biology: Pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2015, pp.1–11.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X.D. & Gill, D.L., 2010a. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), pp.105–109.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X.D. & Gill,

-
- D.L., 2010b. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science (New York, N.Y.)*, 330, pp.105–109.
- Weber, K.S., Miller, M.J. & Allen, P.M., 2008. Th17 cells exhibit a distinct calcium profile from Th1 and Th2 cells and have Th1-like motility and NF-AT nuclear localization. *Journal of Immunology*, 180, pp.1442–1450.
- Wenning, A.S., Neblung, K., Strauß, B., Wolfs, M.J., Sappok, A., Hoth, M. & Schwarz, E.C., 2011. TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, pp.412–423.
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F.D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M. & Brunkow, M.E., 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genetics*, 27, pp.18–20.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.-C., Kastelein, R. a, Cua, D.J., McClanahan, T.K., Bowman, E.P. & de Waal Malefyt, R., 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology*, 8, pp.950–957.
- Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M. & Lewis, R.S., 2006. Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 174, pp.803–813.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. & Rao, A., 2006. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell*, 126, pp.375–387.
- Yamane, H. & Paul, W.E., 2013. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4⁺ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological Reviews*, 252, pp.12–23.
- Yang, Y., Weiner, J., Liu, Y., Smith, A.J., Huss, D.J., Winger, R., Peng, H., Cravens, P.D., Racke, M.K. & Lovett-Racke, A.E., 2009. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206, pp.1549–1564.
- Yarkoni, Y. & Cambier, J.C., 2011. Differential STIM1 expression in T and B cell subsets suggests a role in determining antigen receptor signal amplitude. *Molecular Immunology*, 48, pp.1851–1858.
- Youvan, D., Silva, C., Bylina, E., Coleman, W., Dilworth, M. & Yang, M., 1997. Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivatives on Nickel Chelating Beads. *Biotechnology et alia*, 3, pp.1–18.

-
- Yuan, J.P., Zeng, W., Dorwart, M.R., Choi, Y.-J., Worley, P.F. & Muallem, S., 2009. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate the Orai channels. *Nature Cell Biology*, 11, pp.337–343.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F. & Muallem, S., 2007. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature cell biology*, 9, pp.636–645.
- Zhang, S.L., Yeromin, A. V., Zhang, X.H.-F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A. & Cahalan, M.D., 2006. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp.9357–9362.
- Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D. & Horwitz, D.A., 2007. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *Journal of Immunology*, 178, pp.2018–2027.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Gray, J.D., Horwitz, D.A., Soucier, H. & Horwitz, D.A., 2004. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *Journal of Immunology*, 172, pp.5213–5221.
- Zheng, W. & Flavell, R.A., 1997. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell*, 89, pp.587–596.
- Zheng, Y. & Shen, X., 2005. H₂O₂ directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells. *Redox report : communications in free radical research*, 10, pp.29–36.
- Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H.T., Machnes, D., Oh-Hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A. & Hogan, P.G., 2010. STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nature structural & molecular biology*, 17, pp.112–116.
- Zhou, Y., Sonobe, Y., Akahori, T., Jin, S., Kawanokuchi, J., Noda, M., Iwakura, Y., Mizuno, T. & Suzumura, A., 2011. IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *Journal of Immunology*, 186, pp.4415–4421.
- Zhu, J. & Paul, W.E., 2008. CD4 T cells : fates , functions , and faults. *Immunobiology*, 112, pp.1557–1569.
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28, pp.445–489.
- Zweifach, A. & Lewis, R.S., 1993. Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp.6295–6299.

Danksagung

Ich möchte gerne die letzten Seiten meiner Arbeit nutzen, um mich bei allen zu bedanken die mich in den letzten Jahren auf meinem Weg begleitet und durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Barbara Niemeyer und Dr. Dalia Alansary. Danke, dass ihr mir euer Vertrauen geschenkt und mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen habt ☺. Danke für die Betreuung, eure riesige Expertise rund ums Labor und euren fortwährenden Input, sowohl fachlich als auch menschlich, der einen großen Anteil zu meiner persönlichen und beruflichen Weiterentwicklung beigetragen hat.

Vielen Dank an Prof. Dr. Markus Hoth, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Unterstützung über all die Jahre.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Eva Schwarz für die moralische Unterstützung in Krisensituationen aller Art.

Vielen, vielen Dank Carmen Hässig, Gertrud Schwär, Sandra Janku, Nadine Schönwiese und Cora Hoxa für die herausragende technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Besonders Danken möchte ich Anna-Maria Miederer, Katharina Zimmermann, Kim Friedmann, Cora Hoxa und Kathrin Dörr. Ich danke euch für die großartige Zeit, unsere Frust- und Freudentränen sowie eure Unterstützung in allen Lebenslagen.

Danke an Arne Knörck, meinem Partner am Durchflusszytometer sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit ☺

Ein riesiger Dank an die Herzensmenschen, sowie Yasmin und Edvina, dass ihr immer für mich da wart.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Familie Pascal, Mama, Papa und Maxi: Danke dass ihr immer an mich glaubt, ihr gebt mir Wurzeln und Flügel und macht mich zu dem Menschen der ich bin. Danke für euren Rückhalt und das ich immer auf euch zählen kann. Ihr bedeutet mir alles.

Publikationen

Kircher, S., Merino-Wong, M., Niemeyer, B.A., Alansary, D., Characterization of SOCE and I_{CRAC} of *in vitro* polarized human effector CD4⁺ T cells (in preparation).

Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Chamero, P., Hendrix, P., Oboti, L., Schmid, A., Kircher, S., Pyrski, M., Akiyoshi, S., Khan, M., Vaes, E., Zufall, F. & Mombaerts, P., 2014. A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 34, pp.5121–5133.

Oboti, L., Ibarra-Soria, X., Pérez-Gómez, A., Schmid, A., Pyrski, M., Paschek, N., Kircher, S., Logan, D.W., Leinders-Zufall, T., Zufall, F. & Chamero, P., 2015. Pregnancy and estrogen enhance neural progenitor-cell proliferation in the vomeronasal sensory epithelium. *BMC biology*, 13, pp.104–121.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Alle qRT-PCRs wurden nach meiner Anweisung von Gertrud Schwär durchgeführt
2. Die in 3.9 beschriebene Methode (kinetische Apoptosemessungen), sowie die Auswertung mit Axio Vision erfolgten unter der Anleitung von Christian Backes. Die Auswertung mit Imaris erfolgte unter der Anleitung von Rouven Schoppmeyer
3. Die Isolierung von naiven Lymphozyten erfolgte durch Carmen Hässig
4. Alle verwendeten Imaging-Lösungen wurde von Gertrud Schwär und Petra Fries vorbereitet

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen.

Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift des Promovierenden

.....

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten